



Rodolfo Moresco

**METABOLOMA PARCIAL DE RAÍZES DE GENÓTIPOS DE
MANDIOCA DE MESA (*Manihot esculenta* Crantz), COM
ÊNFASE NAS FRAÇÕES AMÍDICAS E CAROTENOÍDICAS,
COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA À AVALIAÇÃO
DA QUALIDADE NUTRICIONAL E DO POTENCIAL DE USO
INDUSTRIAL.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Vegetal da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do grau de
mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Dr. Marcelo Maraschin.

Co-Orientador: Dr. Alexsander Luis
Moreto.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moresco, Rodolfo

Metaboloma parcial de raízes de genótipos de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz), com ênfase nas frações amídicas e carotenoidicas, como ferramenta biotecnológica à avaliação da qualidade nutricional e do potencial de uso industrial / Rodolfo Moresco ; orientador, Marcelo Maraschin ; co-orientador, Alexsander Luis Moreto. - Florianópolis, SC, 2013.
191 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

Inclui referências

1. Biologia Vegetal. 2. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 3. Propriedades físico-químicas de amido. 4. Carotenoides. 5. Quimiometria. I. Maraschin, Marcelo. II. Moreto, Alexsander Luis. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. IV. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus pais Tarcisio Moresco e Ana Maria Alves Moresco. Por todo amor, carinho, compreensão, fé e estímulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e coragem para nunca desistir, por me proteger, por ter iluminado meus pensamentos para que eu sempre tomasse a melhor decisão e por ter colocado em meu caminho pessoas tão admiráveis que me ajudaram de muitas formas até a conclusão desse trabalho.

Aos meus pais, Tarcísio Moresco e Ana Maria Alves Moresco, por garantirem sempre o melhor pra mim sem se importarem consigo próprios, pelo apoio e estímulo aos estudos, pelo imensurável amor. Jamais conseguirei agradecer tudo que sempre fizeram por mim. Amo muito vocês.

Ao meu Professor Orientador Dr. Marcelo Maraschin, ao qual devo muito da minha formação profissional e pessoal. Um exemplo de mestre, por acreditar no potencial dos seus alunos, pela sua dedicação, preocupação e pela sua generosidade.

Aos meus irmãos, Catarina Moresco Bianchessi, César Moresco e Simoni Moresco, pela força que me deram nos momentos mais difíceis. Agradeço muito a Deus pela família que formamos e pelo nosso companheirismo.

Aos anjos da minha família (Gabriel, Miguel e Davi) que mesmo sem entenderem muitas coisas, forneceram-me algo muito importante, seus sorrisos e carinhos.

Ao amor da minha vida, Caroline Venâncio, pela sua (fundamental) ajuda, pelo bem que me faz, por me entender e me respeitar e pelo seu amor, carinho e aconchego.

À minha sogra, Erotilides Guedes Venâncio e ao meu cunhado Filipe Guedes Venâncio, pelo apoio, respeito e compreensão.

Aos meus grandes amigos Irineu Meschke Junior e Franciele Eccel Martinenghi pelos momentos de descontração tão importantes durante esta jornada, pela amizade espontânea e sincera.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Sinceros agradecimentos aos pesquisadores Dr. Luiz Augusto Martins Peruch, Dr. Alexsander Luís Moreto e Msc. Enildo de Oliveira Neubert, pelo essencial suporte e disponibilidade.

Ao grupo do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), ao qual tenho honra em pertencer, em especial aos amigos do Projeto Repensa: Eduardo da Costa Nunes, Virgílio G. Uarrota e Bianca Coelho, e aos demais Aline Pereira, Amélia Somensi Zeggio,

Maira Tomazzoli, Tiago Carvalho, Fernanda Ramlov, Simone Kobe e Beatriz Veleirinho, que compartilharam a rotina laboratorial e muito mais que isto, amizade, ideias, críticas e risadas!

Agradeço à Eva Regina de Oliveira Rodrigues pelas horas (e horas) de conversas. Muito obrigado pela amizade, afinidade, apoio e principalmente pelos seus conselhos e elogios que foram muito importantes durante esta etapa.

À Professora Edna Regina Amante, pela sua fundamental orientação neste trabalho. Agradeço sua disponibilidade e prontidão. Ao grupo do Laboratório de Frutas e Hortaliças (CAL-UFSC), pela receptividade e ajuda e por compartilharem sua experiência com ensaios reológicos e caracterização amídica.

Ao Professor Carlos Eduardo Maduro Campos, (Laboratório de Difração de raio-X, Departamento de física – UFSC) porque, além da aquisição dos difratogramas e espectros Raman, esteve fortemente envolvido na orientação das análises destes dados. Agradeço pelo tempo dedicado e principalmente pelo seu interesse e sua observação crítica a este trabalho.

À equipe técnica do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), pelo auxílio durante as análises de microscopia eletrônica de varredura, e ao Laboratório de Materiais (LABMAT, Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC) pelos ensaios realizados no picnômetro de gás hélio.

Aos funcionários da UFSC, Maria Luisa Peixoto (técnica do LMBV) e Priscila (secretária do PPG em Biologia Vegetal) pela prestatividade.

À Universidade Federal de Santa Catarina e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, discentes, pessoal técnico e administrativo, pelo conhecimento científico e zelo que me deram.

À Capes pela concessão da Bolsa para realização deste trabalho e ao Governo Brasileiro (CNPq e MCT) pelo financiamento desta pesquisa científica (Edital 22/2010 – CNPq/Reversa. (Desenvolvimento da Cadeia Produtiva da Mandioca na Região Centro-Sul do Brasil).

“Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu: isto é ter sucesso.”

(Ralph Waldo Emerson)

MORESCO, RODOLFO. **Metaboloma parcial de raízes de genótipos de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz), com ênfase nas frações amídicas e carotenóidicas, como ferramenta biotecnológica à avaliação da qualidade nutricional e do potencial de uso industrial.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

RESUMO

A determinação do metaboloma parcial de raízes de genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados por agricultores familiares no estado de Santa Catarina - Brasil e conservados no banco de germoplasma da Epagri representa uma iniciativa inovadora e adequada, pois aprofunda o conhecimento sobre as peculiaridades metabólicas daqueles genótipos, contribuindo a uma caracterização mais detalhada do germoplasma. Esta abordagem subsidia a avaliação do potencial das biomassas radiculares como fontes de compostos de interesse nutricional à saúde humana. Assim, protocolos de análise do metaboloma de mandioca foram estabelecidos, com ênfase em genótipos com polpa pigmentada e potencial uso industrial à produção de fécula. Para tal, uma plataforma analítica típica de estudos metabolômicos e.g., LC, FTIR, UV-vis e DRX, associada a ferramentas de bioinformática, foi utilizada à análise do amido e frações (amilose e amilopectina), à determinação dos perfis carotenóidico e fenólico de amostras de dez acessos de mandioca. Os dados gerados revelam a existência de genótipos com constituições amídicas significativamente distintas. As técnicas analíticas empregadas e os ensaios reológicos realizados, associados às análises quimiométricas (PCAs e *clusters*), possibilitaram discriminar os genótipos de acordo com as peculiaridades físico-químicas e funcionais da fração amídica, sugerindo potenciais de uso industrial eventualmente discrepantes. Em uma segunda abordagem, considerando os conteúdos de metabólitos secundários, raízes de genótipos com polpa branca (Apronta mesa, Oriental, Salézio, Estação e Crioulo de Videira) apresentaram menores concentrações de carotenoides totais ($1,38 \pm 0,75 \mu\text{g.g}^{-1}$ – $5,02 \pm 1,27 \mu\text{g.g}^{-1}$), comparativamente ao genótipo com pigmentação rosada i.e., $169,8 \pm 17,9 \mu\text{g.g}^{-1}$. Genótipos de raízes amarelas (Pioneira, Amarela, Catarina e

IAC-576-70) apresentaram conteúdo médio de $18,1 \pm 3,31 \mu\text{g.g}^{-1}$ de carotenoides totais. A análise cromatográfica identificou os isômeros de posição *cis*- β - e *trans*- β -caroteno (majoritário), além de α -caroteno, luteína e β -criptoxantina nos genótipos analisados, detectando a presença de licopeno somente no genótipo Rosada. Os conteúdos médios de fenólicos totais em raízes frescas variaram de $32,59 \pm 6,34 \mu\text{g.g}^{-1}$ (IAC 576-70) a $128,32 \pm 18,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Rosada). A análise cromatográfica identificou os metabólitos: Epigallocatequina (majoritário), ácido gálico, quercetina, ácido clorogênico, ácido *p*-hidróxibenzóico e epicatequina galato. Tomados em conjunto, os resultados obtidos podem ser empregados como ferramentas de apoio aos programas de melhoramento genético de mandioca assistidos bioquimicamente, otimizando o processo de seleção da diversidade genética existente em bancos de germoplasma. Adicionalmente, os resultados enfatizam a importância da manutenção *on farm* destes genótipos pelos agricultores familiares do sul do Brasil e em bancos de germoplasma, porque representam uma importante fonte de recursos fitogenéticos com características nutricionais e industriais promissoras.

Palavras-chave: Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Amido. Propriedades físico-químicas. Carotenoides. Compostos fenólicos. Quimiometria.

MORESCO, RODOLFO. **Partial metabolome of sweet cassava genotypes (*Manihot esculenta* Crantz), with emphasis on the composition of starch and carotenoids, as biotechnological tool to evaluate their nutritional quality and potential for industrial usage.** Dissertation (Master in Plant Biology) – Pos-graduation Program in Plant Biology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

ABSTRACT

The determination of the partial metabolome of cassava root (*Manihot esculenta* Crantz) of genotypes grown by family farmers in southern Brazil (Santa Catarina state) and conserved at Epagri's genebank represents an innovative and suitable strategy to gain insights as to their metabolic peculiarities. Such an approach also subsidizes the evaluation of the potential of those biomasses as sources of compounds with nutritional interest and industrial usage. Thus, this work developed protocols for the metabolomic analysis of *M. esculenta*, focusing on ten genotypes with roots of pigmented flesh and claimed industrial potential for starch production. For that, the content and the physicochemical properties of the starch fraction and the carotenoid and phenolic profiles of the root samples were determined, by using a typical analytical platform of metabolomics studies, e.g., LC, FTIR, UV-vis, and XRD, associated to bioinformatic tools. Genotypes showed to differ meaningfully as to their starchy constitution. The chemical, rheological, and chemometrics analyzes (PCAs and clusters) allowed discriminating the studied genotypes according to the physicochemical and functional properties of their starch fractions, suggesting eventual distinct potentials for industrial applications. In a second approach, the total content of carotenoids showed to be lower in genotypes with white flesh roots (Apronta mesa, Oriental, Salézio, Estação and Crioulo de Videira - $1.38 \pm 0.75 \mu\text{g.g}^{-1}$ – $5.02 \pm 1.27 \mu\text{g.g}^{-1}$) comparatively to red pigmented ones i.e., $169.8 \pm 17.9 \mu\text{g.g}^{-1}$. Interestingly, in average, genotypes with yellow flesh roots (Pioneira, Amarela, Catarina, and IAC-576-70) showed to contain $18.1 \pm 3.31 \mu\text{g.g}^{-1}$ of total carotenoids. Chromatographic analysis identified the positional isomers *cis*- β - and *trans*- β -carotene (majoritary), as well as α -carotene, β -cryptoxanthin, and lutein in all genotypes investigated and confirmed the presence of lycopene only for the Rosada genotype. In their turn, the mean values of

total phenolic contents in fresh roots ranged from $32.59 \pm 6.34 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (IAC 576-70) to $128.32 \pm 18.20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Rosada) and HPLC analysis identified gallic acid, quercetin, epigallocatechin (majoritary), chlorogenic acid, p-hydroxybenzoic acid, and epicatechin gallate as the main phenolic constituents of the cassava roots samples. Taken together, the results can support biochemically-assisted cassava breeding programs, optimizing the process of selecting the genetic diversity in *M. esculenta* germplasm banks. Furthermore, the results emphasize the importance of *on farm* maintenance of those genotypes, as well as of their germplasm banks, since they represent an important source of genetic resources with promising nutritional and industrial traits.

Keywords: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Starch. Physicochemical properties. Carotenoids. Phenolic compounds. Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da amilose (a) e amilopectina (b).	35
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da conformação de amilose e amilopectina na estrutura do grânulo de amido. Enzimas de degradação podem agir simultaneamente nas extremidades não redutoras e assim aceleram a conversão deste polímero em monossacarídeos.	36
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura lamelar do grânulo de amido de acordo com Donald <i>et al.</i> , (1997). (A) Agrupamento de lamelas microcristalinas separadas por arranjos amorfos. (B) Ampliação das regiões amorfas e cristalinas e estrutura de dupla hélice formada por cadeias de amilopectina contribuindo para a formação da lamela cristalina. Pontos adjacentes constituem a região amorfa.	36
Figura 4 – Diagrama de difração de raio X de amidos de cristalinidade A, B e C.	40
Figura 5 - Curva de viscosidade típica do RVA mostrando as variáveis comumente avaliadas.	43
Figura 6 – Descrição simplificada das principais vias de síntese de metabólitos secundários e suas relações com o metabolismo primário.	46
Figura 7 – Estrutura química dos principais carotenoides encontrados em raízes de <i>M. esculenta</i> Crantz.	47
Figura 8 - Detalhe da estrutura química do β -caroteno e sua clivagem simétrica, originando o retinal, retinol (vitamina A ₁) e dehidro-retinol (vitamina A ₂).	48
Figura 9 - Vias biossintéticas de carotenoides em plantas superiores.	50

Figura 10 – A superexpressão do gene *PHY* é suficiente para favorecer a acumulação de carotenoides em raízes de mandioca. Teores de carotenoides totais nas raízes brancas (*wild-Type*) são de $0,65 \pm 0,06$ (base em peso seco) e $21,84 \pm 0,84 \mu\text{g. g}^{-1}$ nos mutantes (coloração amarela).54

Figura 11- Vias biossintéticas de compostos fenólicos em vegetais superiores.....57

Figura 12 - Micrografias dos grânulos de amido de raízes de genótipos de mandioca. (Escala 10 μm). (A) Apronta mesa. (B) Pioneira. (C) Oriental. (D) Amarela. (E) Catarina. (F) IAC 5767-70. (G) Salézio. (H) Estação. (I) Videira e (J) Rosada...93

Figura 13 - Difratoograma de raio-X típico dos genótipos de mandioca estudados. Os picos de intensidade nos ângulos de difração 2 theta no difratograma são característicos de polimorfismo tipo A.95

Figura 14 – Perfil espectral (ATR-FTIR, 3000 – 600 cm^{-1}) de amostras de amido dos dez genótipos de mandioca estudados. 101

Figura 15– Correlação linear de Pearson para os valores de cristalinidade calculados por IR e DRX e conteúdo de amilose. 103

Figura 16 – Espectro parcial de FTIR (1400–700 cm^{-1}) dos amidos dos genótipos Apronta mesa e Pioneira demonstrando as intensidades dos picos em 1018 cm^{-1} e 999 cm^{-1} , característicos de amilose e amilopectina, respectivamente. .105

Figura 17- Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para as variáveis físico-químicas analisadas em raízes de genótipos de *M. esculenta*. 108

Figura 18 – Similaridades entre amidos de genótipos de mandioca com respeito às suas características físico-químicas e

funcionais. Análise hierárquica com base na distância euclidiana (UPGMA). Correlação cofenética de 65,71%. 109

Figura 19 - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados para os dados espectrais de ATR-FTIR (3000-600 ondas.com⁻¹) dos amidos de mandioca estudados. PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 98,46% a variância presente nos dados. As análises destes componentes, por sua vez, não revelam um claro agrupamento amostral, e uma dispersão das amostras estudadas por todos os quadrantes do gráfico de distribuição fatorial. 110

Figura 20 – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os espectrais de ATR-FTIR (1200-950 ondas.com⁻¹) dos amidos de mandioca estudados. PC1 e PC2 explicaram em 99,2% a variância existente, revelando claramente a existência de dois grupos de genótipos de acordo com suas similaridades. 113

Figura 21- Genótipos IAC-576-70 (A e B) e BRS Rosada (C e D). Raízes frescas (A e C) e cozidas (B e D), respectivamente. 148

Figura 22 - Concentração de carotenoides totais (médias µg.g⁻¹ de peso seco ± desvio padrão, n= 3) em amostras de raízes de genótipos de *M. esculenta* determinada por espectrofotometria UV-visível (450nm, ϵ = de 2592 M⁻¹. cm⁻¹). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey (P<0,05). 153

Figura 23 – Relação entre o conteúdo de carotenoides totais (µg.g⁻¹) para as dez amostras de raízes frescas de *M. esculenta* e retenção de carotenoides (%) após o processamento das raízes. 157

Figura 24 - Perfil cromatográfico (CLAE, 450 nm) típico de carotenoides de raízes do genótipo de mandioca de mesa

“Rosada”, claramente revelando ser o *trans*- β -caroteno o componente majoritário. 158

Figura 25 – Distribuição fatorial dos componentes principais 1 e 2 resultante dos dados do perfil carotenóidico quantitativo determinado por cromatografia líquida de alta eficiência, em raízes de 10 genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, n= 3 repetições). Os genótipos agrupados em PC1-/PC2+ (A), PC1-/PC2- (B) e PC1+/PC2+ (C) apresentam raízes de coloração amarela, branca e rosada, respectivamente. 163

Figura 26 - Perfil espectrofotométrico típico (λ = 200 a 700 nm) do extrato acetona: éter de petróleo, obtido a partir do tecido parenquimático de raízes do genótipo Rosada. 164

Figura 27 - Distribuição fatorial dos componentes principais 1 e 2 resultante dos dados do perfil espectrofotométrico UV visível (200-700 nm), em raízes de 10 genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, n= 3 repetições)..... 166

Figura 28- Distribuição fatorial dos componentes principais 1 e 2 resultante dos dados do perfil espectrofotométrico UV visível (400-500 nm) – região de absorção típica para carotenoides, em raízes de 10 genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, n = 3 repetições). Os genótipos agrupados em PC1-/PC2+, PC2- e PC1+/PC2+, apresentam raízes de coloração branca, amarela, e rosada, respectivamente. 168

Figura 29 – Análise hierárquica (UPGMA) a partir dos dados da varredura espectrofotométrica UV-vis. (400-500 nm) do extrato organosolvente de raízes dos dez genótipos estudados. A similaridade entre genótipos membros de um mesmo *cluster* é significativa estatisticamente quando as ramificações no dendograma apresentam a mesma coloração. 169

Figura 30 - Perfil cromatográfico (CLAE, 280 nm) de compostos fenólicos de raízes do genótipo de mandioca de mesa “Rosada”. 172

Figura 31- Porcentagem de inibição da oxidação do radical DPPH (1, 1-difenil-2 picrilhidrazil) obtida para o extrato metanólico das raízes de mandioca estudadas..... 173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – O impacto de mandioca biofortificada com 2 mg de β -caroteno/100g de peso fresco na ingestão de Vitamina A em países africanos. Considerando que o requerimento médio para mulheres é de 485 $\mu\text{g/d}$, a mandioca biofortificada apresenta impacto positivo na prevenção de cegueira noturna. 53

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e funcionais de amidos dos genótipos de mandioca. Valores são expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). Letras distintas nas colunas representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) pelo teste Tukey. 89

Tabela 3 - Propriedades viscoamilográficas das amostras dos genótipos de mandioca estudados. Temperatura inicial de pasta ($^{\circ}\text{C}$), viscosidade máxima (mPa s), tempo para atingir a viscosidade máxima (min), temperatura no pico de viscosidade máxima ($^{\circ}\text{C}$), viscosidade mínima (mPa s), viscosidade final no ciclo de resfriamento (mPa s), *breakdown* (mPa s) (viscosidade máxima – viscosidade mínima) e *setback* (mPa s) (Viscosidade final – viscosidade mínima). 99

Tabela 4 - Relação entre as absorbâncias de infravermelho em 999 e 1018 ondas.cm^{-1} para os amidos oriundos dos genótipos estudados. 102

Tabela 5 - Concentração de carotenoides totais e valores de retenção daqueles pigmentos (médias $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco \pm desvio padrão, $n= 3$ repetições) em amostras de raízes frescas e cozidas (água destilada em ebulição ($\sim 98^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos) de genótipos de *M. esculenta*. 155

Tabela 6 – Concentração média* ($\mu\text{g/g} \pm$ desvio padrão) de carotenoides totais** e luteína, β -criptoxantina, α -caroteno, *cis*- β -caroteno, *trans*- β -caroteno e licopeno*** em amostras de raízes de genótipos de mandioca determinados por CLAE... 160

Tabela 7 - Concentração de carotenoides (médias $\mu\text{g.g}^{-1} \pm$ desvio padrão, $n= 3$ repetições) em amostras de raízes de genótipos de *M. esculenta* frescas e submetidas ao processo de cozimento (água destilada em ebulição, $\sim 98^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos). *n.d.* – não detectado. 162

Tabela 8 – Concentração média* ($\mu\text{g/g} \pm$ desvio padrão) de fenólicos totais**, ácido gálico, quercetina, epigallocatequina, ácido clorogênico, ácido *p*-hidróxibenzóico e epicatequina galato*** em amostras de raízes de genótipos de mandioca determinados por CLAE. 171

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 <i>MANIHOT ESCULENTA</i> CRANTZ - BOTÂNICA, ORIGEM E DOMESTICAÇÃO.....	31
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E ALIMENTAR	32
2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO.....	32
2.4 COMPOSIÇÃO AMÍDICA	33
2.4.1 Propriedades dos amidos	37
2.4.2 O amido de mandioca	38
2.4.3 Características físico-químicas e morfológicas dos grânulos de amido	39
2.4.3.1 <i>Cristalinidade dos grânulos de amido</i>	39
2.4.3.2 <i>Características reológicas do amido</i>	41
2.4.3.3 <i>Poder de inchamento</i>	41
2.4.3.4 <i>Viscosidade</i>	42
2.4.3.5 <i>Retrogradação</i>	44
2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	44
2.5.1 Carotenoides	46
2.5.2 Manihot esculenta como fonte de carotenoides provitamina A	49
2.5.3 Variabilidade de carotenoides em Manihot esculenta	50
2.5.4 Biofortificação	51
2.5.4.1 <i>Biofortificação de Manihot esculenta</i>	52
2.5.5 Retenção de carotenoides em raízes de mandioca	54
2.5.6 Biodisponibilidade e isomerização de carotenoides em mandioca	55
2.6 COMPOSTOS FENÓLICOS	56
3 OBJETIVOS	59
3.1 OBJETIVO GERAL.....	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

CAPÍTULO 1.....	77
Caracterização físico-química e propriedades viscoamilográficas de amidos de genótipos de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).	
1 INTRODUÇÃO	79
2 MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1 SELEÇÃO DOS GENÓTIPOS	81
2.2 ISOLAMENTO E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO AMIDO.....	81
2.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS.....	82
2.3.1 Concentração de amilose (método iodométrico)	82
2.3.2 Densidade absoluta	82
2.3.3 Capacidade de adsorção lipídica e de água	82
2.3.4 Poder de Inchamento do amido – PI (%)	83
2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	83
2.4.1 Diâmetro dos grânulos de amido	83
2.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	84
2.5.1 Índice de Cristalinidade (IC) da fração amídica	84
2.6 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	84
2.7 RAPID VISCO ANALYSER (RVA).....	85
2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	85
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	87
3.1.1 Rendimento de extração	87
3.1.2 Concentração de amilose	87
3.1.3 Densidade absoluta	88
3.1.4 Capacidade de adsorção lipídica e de água	90
3.1.5 Poder de Inchamento	90
3.1.6 Forma e diâmetro dos grânulos	91
3.1.7 Índice de Cristalinidade	94
3.1.8 Propriedades de Pasta (RVA)	96

3.1.9 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio (FTIR).....	100
3.2 ANÁLISES DE COMPONENTES PRINCIPAIS E CLUSTERS.....	106
4 CONCLUSÕES	115
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
APÊNDICES	127

CAPÍTULO 2	141
-------------------------	-----

Análise de carotenoides e compostos fenólicos em raízes de genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) por espectrofotometria uv-visível, cromatografia líquida de alta eficiência e quimiometria e influência do processo de cozimento na retenção de carotenoides.

1 INTRODUÇÃO	143
---------------------------	-----

2 MATERIAL E MÉTODOS	147
-----------------------------------	-----

2.1 GERMOPLASMA	147
-----------------------	-----

2.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS.....	149
--	-----

2.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CAROTENOÍDICO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	149
---	-----

2.4 ANÁLISE DA RETENÇÃO DE CAROTENOIDES	150
---	-----

2.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	150
---	-----

2.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	150
---	-----

2.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	151
--	-----

2.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (1, 1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL)	151
--	-----

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	152
---------------------------------	-----

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	153
---------------------------------------	-----

4 CONCLUSÕES	175
---------------------------	-----

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179
---	-----

APÊNDICES	184
------------------------	-----

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família Euforbiácea. Originária do continente americano, já era cultivada no Brasil pelos indígenas, por ocasião da sua “descoberta”. Essa espécie tem um aspecto social muito importante, pois serve com alimento energético básico na dieta de mais de 800 milhões de pessoas, em diversos países (NASSAR & ORTIZ, 2010). Produtiva em solos deficientes em fertilidade é muito tolerante às doenças, à seca e às pragas, além de ser flexível quanto à época de colheita. Por ser uma cultura rústica, adaptada a variados ambientes, sem grandes exigências em agroquímicos e sem depender de sementes, despertou pouco interesse das corporações controladoras da “agricultura moderna” permanecendo por longo tempo à margem das atenções dos governos e do agronegócio. Atualmente, devido à sua importância cultural e econômica frente à agricultura familiar e às preocupações crescentes relacionadas à segurança alimentar, conservação dos recursos fitogenéticos e aspiração por modelos de produção agrícolas mais sustentáveis, têm-se buscado resolver os principais gargalos tecnológicos e organizacionais gerados por essa histórica desconsideração.

Neste contexto, a produção de raízes de *M. esculenta* vem se mostrando uma atividade remuneradora e muito adequada à realidade da agricultura familiar. Não obstante possui entraves tecnológicos, como por exemplo, a demanda por materiais genéticos mais produtivos e com qualidade industrial e nutricional superior. A expansão do mercado de mandioca depende, portanto, de variedades com boas qualidades culinárias e com respaldo positivo às exigências tecnológicas. Este cenário enfatiza a importância da busca de materiais genéticos adaptados, de melhor desempenho e que gerem possibilidades de agregação de valor.

Em *M. esculenta*, a parte mais importante da planta é a raiz, rica em amido, utilizada na alimentação humana e animal, ou como matéria-prima industrial. A fração amídica é formada basicamente por dois polissacarídeos, i.e., amilose e amilopectina, sendo a relação de conteúdos destas duas macromoléculas variável de acordo com a fonte botânica, o que irá determinar características específicas à pasta de amido (CEREDA *et al.*, 2001).

Estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado que a fonte de amido pode influenciar de modo determinante diversos processos tecnológicos da indústria alimentícia, como a textura e a retenção de água de determinados alimentos, assim como processos metabólicos vitais da nutrição humana, como a resposta glicêmica ao alimento ingerido. Esses eventos estão intimamente relacionados a muitas características estruturais do amido, como teor de amilose, distribuição de comprimento das cadeias de amilopectina e cristalinidade no grânulo, sendo também associados a algumas etapas dos processos de gelatinização e retrogradação, como inchamento do grânulo, lixiviação de amilose e/ou amilopectina, etc. Tais características demonstram que estudos sobre a caracterização estrutural de frações amídicas podem ser usados como marcadores bioquímicos para avaliar a diversidade química entre variedades, e.g. genótipos de mandioca, e também são importantes a fim de dirigir e otimizar suas aplicações tecnológicas e nutricionais. Isso é extremamente relevante, pois, a maior parte dos amidos nativos não possui as propriedades funcionais requeridas e por isso tem um uso limitado na indústria (KUHNEN, 2007).

Numa segunda abordagem, estudos indicam o potencial de *M. esculenta* como fonte de compostos de interesse à saúde humana e nutrição, dada à presença de carotenoides provitamina A (β -caroteno, e.g.) e licopeno nas raízes de coloração amarela e rosada, respectivamente (NASSAR *et al.*, 2007) e compostos fenólicos, como os flavonoides galocatequina, catequina e catequinagalato (BLAGBROUGH *et al.*, 2010). Estudos epidemiológicos sugerem uma correlação positiva entre uma dieta rica em carotenoides e compostos fenólicos e a redução na incidência de alguns tipos de câncer (HUGHES, 2001; CARVALHO *et al.*, 2010), sendo também amplamente reconhecido o efeito antioxidante e inibidor da ação de radicais livres desses metabólitos (PALOZZA, 2005). No organismo humano, os carotenoides possuem uma função importante como precursores da vitamina A, sendo o β -caroteno, α -caroteno e a β -criptoxantina os principais carotenoides que apresentam esta atividade. A deficiência de vitamina A é um grande problema nutricional em países em desenvolvimento, causando cegueira, xerofthalmia e mortes prematuras, especialmente em crianças (SCOTT; RODRIQUEZ-AMAYA, 2000). Assim, a presença desses metabólitos secundários indica uma funcionalidade adicional à matéria-prima e aos produtos derivados de mandioca. No entanto, a despeito de sua importância, há

poucos dados na literatura com relação à caracterização de seus micronutrientes, principalmente no que diz respeito ao seu metabolismo secundário (CHAMPAGNE *et al.*, 2010). Tais características evidenciam a importância de pesquisas de caracterização das biomassas de genótipos de *M. esculenta*, subsidiando o desenvolvimento de novas aplicações da matéria-prima dessa espécie junto às indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, por exemplo.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI - Estação Experimental de Urussanga - EEUR) é detentora do banco de germoplasma de mandioca com maior variabilidade genética do Brasil. Contudo, destaca-se a quase total escassez de informações sobre a composição química e o valor nutricional destes genótipos¹. Neste contexto, a presente proposta visa desenvolver protocolos de análise do metaboloma de mandioca (com ênfase em genótipos com polpa pigmentada e genótipos industriais para produção de amido) que possibilitem sua utilização como ferramentas auxiliares nos processos de identificação e seleção de genótipos de mandioca, oriundos do programa de melhoramento da Epagri. Neste sentido, foram analisados por métodos analíticos típicos de uma plataforma metabolômica, i.e., LC, FTIR, UV-vis, DRX, associados às ferramentas de bioinformática, o amido e suas frações (amilose e amilopectina), além da determinação do perfil carotenóidico e de compostos fenólicos de amostras de dez genótipos de mandioca. Assume-se que o uso concomitante destas tecnologias analíticas seja uma ferramenta eficiente na busca e definição de genótipos com teores superiores de metabólitos-alvo, de importância em programas de melhoramento genético assistido, subsidiando a seleção de genótipos parentais promissores e/ou potenciais. Além disso, o acesso às peculiaridades químicas destes genótipos que revelam características industriais, nutricionais e eventuais benefícios à saúde humana gera possibilidades adicionais de uso da biomassa em questão, podendo agregar-lhes valor, amenizando o quadro de baixo retorno econômico associado ao seu cultivo, com consequências positivas sobre a qualidade

¹ Neste trabalho utilizou-se o termo “genótipo” para designar os acessos, cultivares, variedades ou etnovariedades depositados em banco de germoplasma, quando estes apresentam fenótipos característicos e peculiares condicionados pelo mesmo efeito ambiental.

de vida das populações rurais, permitindo a manutenção das mesmas nessa atividade e a conservação daqueles genótipos.

Dessa forma o presente estudo objetivou determinar as características físico-químicas, morfológicas e funcionais da fração amídica e caracterizar o perfil carotenóidico e fenólico de raízes de dez genótipos de mandioca oriundos do banco de germoplasma da Epagri.

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados em dois capítulos, sendo o primeiro referente à caracterização da fração amídica e o segundo à análise de carotenoides e compostos fenólicos nas raízes dos genótipos estudados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Manihot esculenta* Crantz - BOTÂNICA, ORIGEM E DOMESTICAÇÃO.

A mandioca pertence à ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz, pertencente à classe das dicotiledôneas. O gênero *Manihot* é composto por 98 espécies com diferentes hábitos de desenvolvimento, arbustivos ou arbóreos. *M. esculenta* é a única espécie desse gênero que produz raízes comestíveis, considerando o acúmulo de amido naqueles órgãos (ROGER & APPAN, 1973).

As variedades de mandioca são comumente classificadas como “mansa” (atóxica) ou “brava” (tóxica), dependendo do teor de compostos cianogênicos em suas raízes. A mandioca mansa, também denominada popularmente de mandioca de mesa, aipim ou macaxeira, se diferencia da mandioca denominada brava ou industrial, principalmente, por apresentar baixos teores de HCN (ácido cianídrico) na raiz, ou seja, abaixo de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de raízes frescas (BOLHUIS *et al.*, 1954). Assim, as mandiocas mansas se destinam ao consumo humano *in natura* e as bravas às indústrias de transformação, principalmente farinha e amido.

Apesar da sua importância econômica, as origens evolutivas e geográficas da cultura de *M. esculenta* ainda são controversas (OLSEN, 2004). O Brasil é o país com o maior centro de diversidade de espécies de *Manihot* (NASSAR; HASHIMOTO & FERNANDES, 2008). Segundo Fukuda e Otsubo (2003), a mandioca é originária das Américas e possivelmente do Brasil Central, mas há evidências de seu cultivo por civilizações Incas há 4000 anos na América Central, Venezuela, Colômbia e Peru. Estudos evidenciam que a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz spp. *esculenta*) possivelmente foi domesticada de populações selvagens de *M. esculenta* da subespécie *flabellifolia* (ALLEM, 2002), na extensão da fronteira sul da bacia Amazônica (OLSEN & SCHAAL 1999). Segundo Elias *et al.*, (2004), há evidências de que as raízes de mandiocas consideradas “brava” e de mesa, após o período de domesticação, evoluíram em locais distintos, divergindo geneticamente em alguma extensão. Sabe-se, contudo, que *M. esculenta* foi domesticada e cultivada por nativos americanos e disseminada à África e Ásia após a chegada dos europeus no século

XVI. Seu cultivo em regiões tropicais do globo estende-se numa faixa de 30° de latitude norte e a sul do Equador.

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E ALIMENTAR

Atualmente, a mandioca ocupa a posição da terceira cultura mais importante, como fonte de calorias, do mundo, dentre o grupo das culturas alimentícias básicas, que inclui o arroz e o milho (FAO, 2012). O continente africano lidera a produção de mandioca, representando 55,8% do volume total que é produzido, seguido do continente asiático com 30,4% e o americano com 13,6%. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca com 10% do volume total de produção, perdendo apenas para a Nigéria que produz 20,8%. A safra brasileira de 2011 foi de 25,35 milhões de toneladas, em uma área plantada de 1,73 milhão de hectares (IBGE, 2011).

A farinha e o amido de mandioca são os principais produtos de interesse à indústria, sendo o amido e seus derivados utilizados em produtos tanto para a alimentação humana quanto a outros fins industriais, tais como: alimentos embutidos, embalagens, colas, mineração, têxtil e farmacêutica (CARDOSO & SOUZA, 2002). Mais da metade do amido de mandioca produzido no Brasil é utilizado por indústrias alimentícias na forma nativa do amido, destacando-se as indústrias de biscoitos, iogurtes, panificação, chocolates e bombons, conservas entre outras (CEREDA *et al.*, 2001). Além disso, boa parte da mandioca de “mesa” é consumida na forma *in natura* e já vem sendo comercializada nas formas pré-cozida e congelada.

Apesar de competir com os cereais, a mandioca como matéria-prima para processos industriais é uma das principais fontes amiláceas no mundo (CEREDA *et al.*, 2001). Tal fato está associado à grande capacidade adaptativa desta espécie, especialmente em regiões com deficits hídricos e solos pobres, condições nas quais muitos cereais não apresentam bom desenvolvimento (NASSAR; HASHIMOTO; FERNANDES, 2008).

2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO

Por ser uma cultura perene e devido à sua rusticidade pode ser mantida *on farm*, constituindo bancos de germoplasma. Como a mandioca é cultivada em quase todo o território brasileiro uma alta variabilidade genética é suposto existir. No entanto, a maior parte desta

ainda não foi utilizada em programas de melhoramento genético. Além disto, pelo fato dessas variedades terem sido cultivadas e sofrerem seleções ao longo do tempo pelos “agricultores-melhoristas”, pode haver variedades com características de interesse agrônomo e industrial no âmbito das pequenas propriedades, as quais ainda não foram identificadas e introduzidas em bancos de germoplasma (SILVA *et al.*, 2002).

Em programas de melhoramento genético de mandioca, os principais métodos utilizados são a introdução e seleção de variedades e as hibridizações intraespecíficas. A introdução e seleção de variedades é o método mais comum por ser menos oneroso e por apresentar grande chance de êxito (IGLESIAS *et al.*, 1997). As propriedades buscadas com essas ações são maior valor nutricional, maior concentração de amido e menor teor de ácido cianídrico, dentre outros atributos que tornem as novas variedades mais completas, competitivas e atraentes ao mercado. Um exemplo de melhoramento do valor nutricional é o trabalho com o genótipo Rosada, desenvolvido no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de Cali, Colômbia – o detentor do maior banco de germoplasma de *M. esculenta* no mundo. Por meio de pesquisas genéticas, foi possível aumentar o teor de licopeno, um antioxidante recomendado na prevenção do câncer, principalmente o de próstata (FUKUDA, 2006).

No Brasil, cerca de sete mil variedades estão disponíveis ao melhoramento genético, concentradas nos principais bancos de germoplasma do país: o Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPQ, da Embrapa), o Cenargen (da divisão Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa), a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

2.4 COMPOSIÇÃO AMÍDICA

A sacarose e o amido são sintetizados a partir de triose fosfato gerados pelo ciclo de Calvin e representam as duas principais formas de armazenamento de carbono e energia nos vegetais superiores. A sacarose, sintetizada no citosol, é a principal forma de carboidrato translocável pela planta, através do floema. O amido, carboidrato de reserva energética, é insolúvel em água e sintetizado nos cloroplastos e amiloplastos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

No processo de tuberação, a sacarose produzida pela fotossíntese nas folhas é armazenada nos cloroplastos na forma de amido transitório, o qual é depois degradado para nova síntese de sacarose. Esta é então translocada pelo floema para o interior das células dos órgãos de reservas subterrâneos, acumulando-se nos vacúolos, onde é degradada por invertases, liberando glicose e frutose, que são fosforiladas por suas respectivas quinases, entrando no amiloplasto e iniciando a formação dos grânulos de amido.

A síntese de amido é similar nos cloroplastos e amiloplastos, envolvendo a presença das enzimas pirofosforilase ADP-glicose, que é uma enzima chave na síntese de amido, promovendo o alongamento das cadeias α -1,4; e das enzimas ramificantes, responsáveis pela formação da microestrutura do grânulo do amido (TAIZ & ZEIGER, 2009). O desenvolvimento do grânulo de amido dentro do amiloplasto ocupa uma proporção crescente do volume daquela organela, até que com o grânulo totalmente desenvolvido, o volume interno seja completamente ocupado (GALLIARD & BOWLER, 1987).

Dentre os polissacarídeos, somente o amido se organiza na forma de grânulos, que são densamente empacotados em uma estrutura semicristalina. A cristalinidade varia de 15 a 45% e a densidade em torno de $1,5 \text{ g/cm}^3$. Na sua forma granular, o amido pode ser facilmente isolado pela gravidade, sedimentação, centrifugação e filtração. Os grânulos se desenvolvem ao redor do ponto de nucleação, denominado de hílum, sendo a forma e o tamanho dependentes da espécie botânica (LIU, 2005).

Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -(1,4), originando uma cadeia linear, podendo apresentar pequenas ramificações. Por sua vez, a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -(1,4), apresentando em torno de 5% pontos de ramificações α -(1,6), formando uma estrutura ramificada (PÉREZ & BERTOFT, 2010) (Figura 1).

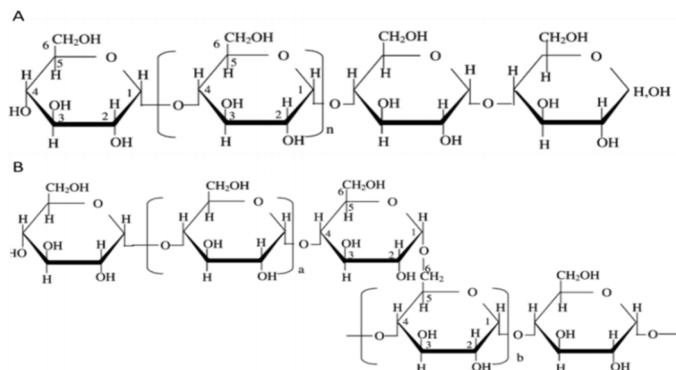


Figura 1 – Estrutura da amilose (a) e amilopectina (b).

Fonte: Adaptado de Tester *et al.* (2004).

Embora representada por uma estrutura de cadeia linear, a amilose é, de fato, frequentemente helicoidal, permitindo formar complexos com ácidos graxos livres e com o iodo. A complexação com o iodo é uma importante ferramenta de diagnóstico para caracterização do amido. Complexos de amilose com gorduras e emulsificantes como mono e diglicerídeos podem alterar a temperatura de gelatinização do amido, a textura e o perfil de viscosidade da pasta resultante, limitando a retrogradação (MATSUGUMA, 2006).

A amilose é um dos componentes responsáveis pela estrutura do grânulo e sua quantificação é de grande importância para se entender o comportamento do amido. Conforme relatado por Hu *et al.* (2010), a pequena ramificação química na estrutura da amilose contribui para o seu valor nutricional. Enzimas de degradação podem agir simultaneamente nas pontas não redutoras (existentes nas ramificações externas da amilopectina) e assim aceleram a conversão deste polímero em monossacarídeos (Figura 2). Logo, a amilose é menos susceptível à ação enzimática sendo melhor para estocar energia, devido a sua estrutura não ramificada com menos pontas não redutoras (NELSON & COX, 2006). A amilose é digerida mais lentamente, fornecendo benefícios à saúde humana. Estudos clínicos recentes indicam que a amilose é importante na redução do impacto glicêmico e da insulina (BEHALL & SCHOFIELD, 2005) e em aumentar a capacidade do corpo em metabolizar gorduras, o que ajuda a manter o peso de forma saudável (HIGGINS *et al.*, 2004).

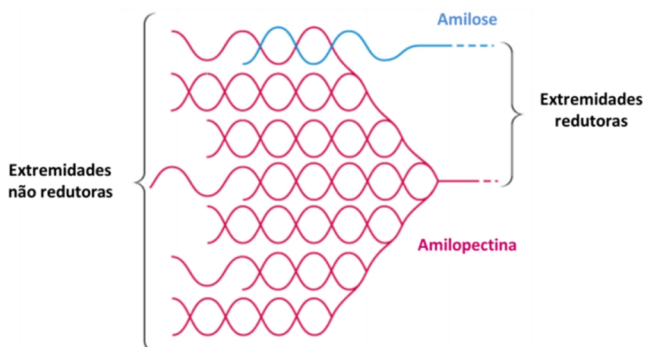


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da conformação de amilose e amilopectina na estrutura do grânulo de amido. Enzimas de degradação podem agir simultaneamente nas extremidades não redutoras e assim aceleram a conversão deste polímero em monossacarídeos.

Fonte: Nelson & Cox (2006).

A amilopectina tem um papel principal na cristalinidade dos grânulos de amido sendo, estrutural e funcionalmente, a mais importante das duas frações, pois sozinha é suficiente para formar o grânulo, como ocorre em mutantes que são desprovidos de amilose. A região cristalina do grânulo de amido é formada por cadeias laterais de amilopectina, enquanto a região amorfa é composta por pontos adjacentes da amilopectina e por amilose. Assim, a cristalinidade do grânulo está, principalmente, relacionada às duplas hélices formadas pelas ramificações de amilopectina (Figura 3) (HOOVER, 2001).

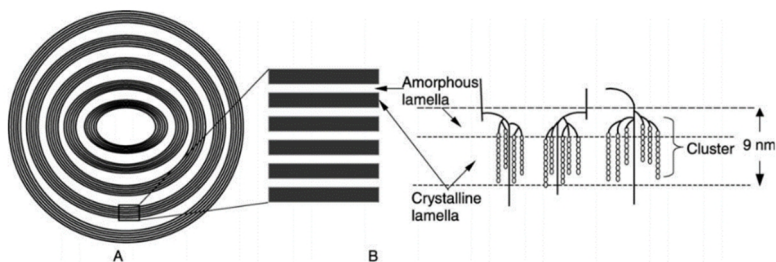


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura lamelar do grânulo de amido de acordo com Donald *et al.*, (1997). (A) Agrupamento de lamelas microcristalinas separadas por arranjos amorfos. (B) Ampliação das

regiões amorfas e cristalinas e estrutura de dupla hélice formada por cadeias de amilopectina contribuindo para a formação da lamela cristalina. Pontos adjacentes constituem a região amorfa.

A funcionalidade do amido, assim como a organização física na estrutura granular é, em grande parte, atribuída à proporção entre a amilose e a amilopectina (AMANTE, 1986). Por estar ligada ao desenvolvimento da planta, a estrutura do amido está também intimamente relacionada às condições agrônômicas do local de cultivo. Alterações de clima, por exemplo, podem influenciar na formação do grânulo e na deposição do amido. Esses fatores, por sua vez, podem interferir no tamanho e na formação do grânulo de amido (DAIUTO & CEREDA, 2004).

2.4.1 Propriedades dos amidos

A estrutura macromolecular do amido interfere em suas características físico-químicas tais como solubilidade, viscosidade, poder de gelatinização e de adesão. Amidos naturais podem não apresentar propriedades adequadas ao uso industrial, de modo que as empresas de alimentos, cosmética e farmacêutica recorrem, em muitos casos, ao uso de amidos modificados. As razões que levam à modificação, segundo BeMiller (1997) são: otimizar as características de cozimento (gelatinização), diminuir a retrogradação, reduzir a tendência das pastas em formarem géis, aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e congelamento, aumentar a transparência das pastas ou géis, melhorar a formação de filmes, aumentar a adesividade, adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (CEREDA *et al.*, 2001).

Neste contexto, as indústrias de alimentos e os produtores agrícolas estão interessados na identificação e no desenvolvimento de espécies que produzam amidos nativos com características físico-químicas especiais e propriedades semelhantes a dos amidos modificados. Esses amidos poderiam substituir amidos modificados quimicamente, ou ainda abrir novos mercados para espécies ainda não valorizadas (KIM *et al.*, 1995).

As propriedades do amido envolvem suas características físicas (densidade e tamanho do grânulo, cristalinidade, morfologia, condutibilidade térmica e elétrica e atividade ótica); químicas (teores de amilose, amilopectina e outros constituintes e.g. lipídeos e proteínas) e

funcionais (poder de inchamento, gelatinização, retrogradação e hidrólise) (CEREDA *et al.*, 2001).

2.4.2 O amido de mandioca

As fontes de amido mais utilizadas mundialmente são de cereais, como milho e trigo, e de raízes e tubérculos, como batata, mandioca e batata-doce (FRANCO; DEMIATE; ROCHA, 2008).

O amido de mandioca apresenta vantagens, pois é facilmente extraído, já que as raízes contêm pequenas quantidades de proteínas, gorduras e outros componentes. Dessa forma, o processo de extração é simples e o amido obtido é puro e branco. De modo geral, o amido de mandioca é constituído do polissacarídeo quase puro (99,26 %), contendo aproximadamente 0,34 % de proteína, 0,22 % de gordura e 0,06 % de cinzas (AMANTE, 1986). Por apresentar o conteúdo de lipídeos baixo, o amido de mandioca e seus derivados não apresentam sabor e aroma de cereais, o que é desejável para muitos produtos alimentícios. Na indústria alimentícia, principalmente no setor frigorífico, é um importante substituto para o amido de milho (DEMIATE *et al.*, 2005).

O amido de mandioca apresenta cerca de 18 % de amilose, enquanto que os amidos de cereais possuem em torno de 22 %. Devido a essa diferença, os géis de amidos de cereais são mais rígidos, comparativamente aqueles de espécies tuberosas que são mais viscosos e transparentes (FRANCO *et al.*, 2002).

O amido de mandioca apresenta forma arredondada, com uma das extremidades truncada e tamanho de grânulos que variam de 5 a 40 µm (JANE *et al.*, 1994). Quando aquecido em água, este amido apresenta alta viscosidade e baixa tendência a retrogradação (SWINKELS, 1985). Dentre os amidos de raízes e tubérculos, é um dos que apresenta menor temperatura inicial de gelatinização, i.e., valores médios em torno de 60 °C (HOOVER, 2001). Somadas a estas características, a mandioca é ainda uma das culturas agrícolas mais cultivadas nos trópicos, com a produtividade superior a outras culturas agrícolas fontes de amido, necessitando de baixos *inputs* de energia para expressar seu potencial produtivo (MONTAGNAC *et al.*, 2009).

2.4.3 Características físico-químicas e morfológicas dos grânulos de amido

Segundo Tester *et al.*, (2004), a forma (redondo, oval, poliédrico), o tamanho de partícula (2 a 100µm) e a distribuição de tamanho da partícula dos grânulos são características da origem botânica dos amidos. Amidos com morfologias diversas têm mostrado susceptibilidades peculiares à hidrólise enzimática. O tamanho e forma dos grânulos podem ser avaliados através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SOUZA & ANDRADE, 2000).

Os grânulos de amido de mandioca apresentam diâmetros similares aos de amido de milho, porém são morfológicamente diferentes. São ovais ou redondos com alguns côncavo-convexos característicos. Quanto à permeabilidade, a superfície do grânulo é relativamente impermeável a moléculas grandes, como amilases, devido ao compacto empacotamento das cadeias de amilopectina (ELIASSON, 2004). Os grânulos de amido são insolúveis em água fria; no entanto, se a continuidade da membrana exterior tiver sido destruída pela moagem, a absorção de água pode ser facilitada. Por tratamento do grânulo intacto com água quente, uma parte solúvel do amido difunde através da parede do grânulo. Em água quente, os grânulos incham e evoluem para o rompimento (MORRISON & BOYD, 1996).

2.4.3.1 Cristalinidade dos grânulos de amido

Na planta, o amido é armazenado como corpos intracelulares parcialmente cristalinos denominados grânulos. Por meio de difração de raios-X, podem-se distinguir três tipos de grânulos que, dependendo da sua forma e estrutura cristalina, denominam-se A, B e C (Figura 4) (CEREDA *et al.*, 2001; ZOBEL, 1988). Estes padrões de cristalinidade dependem, em parte, do comprimento das cadeias de amilopectina, da densidade de empacotamento dentro dos grânulos, bem como da presença de água (SAJILATA; SINGHAL, KULKARNI, 2006).

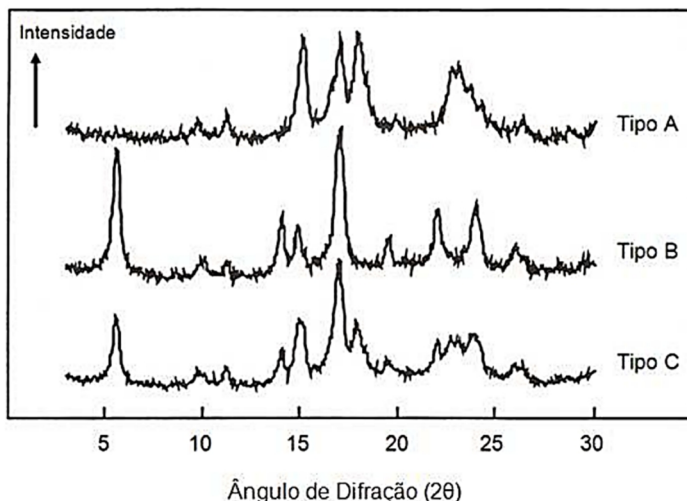


Figura 4 – Diagrama de difração de raio X de amidos de cristalinidade A, B e C.

Fonte: Bertolini (2000).

Segundo Zobel (1964), os grânulos de amido apresentam as seguintes características de cristalinidade quanto ao tipo:

- Tipo A – Apresentam picos de intensidade nos ângulos de difração 2θ em $15,3^\circ$, $17,8^\circ$ e $23,5^\circ$.
- Tipo B - Apresentam picos de intensidade nos ângulos de difração 2θ em $5,6^\circ$, $14,4^\circ$, $17,2^\circ$, $22,2^\circ$ e 24° .
- Tipo C - Apresentam picos de intensidade nos ângulos de difração 2θ em $5,6^\circ$, $15,3^\circ$, $17,3^\circ$ e $23,5^\circ$.

As cadeias externas relativamente curtas das moléculas de amilopectina (entre 23 e 29 unidades de glucose) favorecem a formação de polimorfos cristalinos tipo A, comumente encontrado em cereais. Já as cadeias externas maiores de amilopectina (entre 33 e 44 unidades de glucose) favorecem a formação de polimorfos tipo B, encontrados em amido de banana, amidos retrogradados e amidos ricos em amilose. O polimorfo tipo C é composto por moléculas de amilopectina com 26 a 29 moléculas de glucose, é considerado um intermediário entre A e B, sendo característico de amido de leguminosas e sementes (ELIASSON

& GUDMUNDSSON, 2006). Geralmente, amidos de tuberosas e raízes exibem padrão de difração tipo B, porém tem sido reportado por Franco, Ciacco e Tavares (1988), Moorthy (1985), Gallant *et al.*, (1982) e Rosenthal *et al.*, (1974) que o amido de mandioca apresenta padrão de difração tipo - A.

O amido apresenta duplas hélices, com certa semelhança ao modelo proposto para a estrutura do DNA. Os modelos cristalinos para os padrões A e B variam tanto com a quantidade de água que hidrata os resíduos de glucose, como também com a densidade de empacotamento do arranjo cristalino (THOMAS & ATWEL, 1999).

2.4.3.2 Características reológicas do amido

A reologia tem sido definida como o estudo da deformação dos objetos sob a influência de forças aplicadas a eles (LEWIS, 1993). As características reológicas das pastas ou géis de amido dependem, dentre outros fatores, da configuração e do poder de intumescimento dos grânulos, teor de amilose lixiviado durante o rompimento do grânulo e da interação entre os componentes da pasta (NAVARRO *et al.*, 1996).

2.4.3.3 Poder de inchamento

O poder de inchamento é uma medida da capacidade de hidratação dos grânulos, porque a sua determinação consiste no peso do grânulo intumescido (inchado) e da água oclusa (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007).

O inchamento e a solubilidade do grânulo variam de acordo com a fonte botânica do amido, fornecendo evidências da interação entre as cadeias nos domínios amorfos e cristalinos dos polissacarídeos. A extensão destas interações é influenciada pela proporção amilose/amilopectina e pelas características dessas moléculas (distribuição e massa molecular, grau e comprimento de ramificações e conformação) (SINGH *et al.*, 2003).

Quando os grânulos de amido intactos são colocados em água fria, não são solúveis, mas podem reter pequenas quantidades de água, devido à difusão e absorção de água nas regiões amorfas, um processo reversível pela secagem (HOSENEY, 1986; WHISTLER & DANIEL, 1993). No entanto, quando o amido é aquecido em excesso de água, acima da temperatura de gelatinização, a estrutura cristalina é rompida devido ao relaxamento das ligações de hidrogênio e as moléculas de

água interagem com os grupos hidroxilas da amilose e da amilopectina. Isso causa um aumento do tamanho do grânulo devido ao inchamento, com solubilização parcial (HOOVER, 2001).

Segundo Ratnayake e Jackson (2006), a absorção de água pelos grânulos de amido nas regiões amorfas desestabiliza sua estrutura cristalina, resultando na perda da birrefringência, que é uma das definições de gelatinização. Sob aquecimento contínuo, os grânulos incham mais, levando à perda da estrutura cristalina, o que pode causar a completa separação da amilose e amilopectina. Tester e Morrison (1990) reportaram que o inchamento do amido é primariamente uma propriedade da amilopectina, porque amidos cerosos usualmente incham mais, comparativamente a amidos com baixo teor daquele polissacarídeo. Por sua vez, Gomand *et al.* (2010) relatam que durante o inchamento a amilose atua como diluente. De fato, amidos ricos em amilose mostram inchamento e solubilidade restritos, mesmo após um período prolongado de aquecimento (LEACH *et al.*, 1959).

2.4.3.4 Viscosidade

O momento em que desaparece a birrefringência é conhecido como ponto ou temperatura de gelatinização, que normalmente ocorre dentro de uma faixa de temperaturas, gelatinizando primeiramente os grânulos maiores e posteriormente os menores. Já o empastamento é o fenômeno seguinte à gelatinização na dissolução de amido. Envolve inchamento granular, separação dos componentes moleculares e, eventualmente, total rompimento dos grânulos. É nesta etapa que ocorre o aumento da viscosidade do gel (WHISTLER & DANIEL, 1993).

Segundo Whistler e BeMiller (1997), a formação da pasta ocorre porque com o aumento da temperatura da suspensão amido/água as moléculas constituintes do grânulo daquele polissacarídeo vibram e giram violentamente, fazendo com que as ligações de hidrogênio intermoleculares sejam quebradas e substituídas com moléculas de água, o que produz uma hidratação extensiva. O efeito de mobilidade é percebido primeiramente nas regiões amorfas, as quais estão em estado vítreo, não cristalino. Quando os grânulos aquecidos na presença de até 60% de água, que é plasticizante para o amido, alcançam a sua temperatura de transição vítrea, as regiões amorfas plasticizadas sofrem uma transição de fase, passando do estado vítreo para o estado pastoso.

A construção das curvas de viscosidade representa importante ferramenta às observações do comportamento do gel de amido e de suas

relações com as condições de processamento: aquecimento, agitação e resfriamento (MARCON; AVANCINI & AMANTE, 2007). O perfil de empastamento de amidos obtidos pelo RVA (Rapid Visco Analyser) inclui pico de viscosidade, tempo para atingir este pico, quebra, viscosidade final, temperatura de pasta e tendência à retrogradação (*setback*) (THOMAS & ATWELL, 1999), como mostrado na Figura 5. Dependendo do tipo de amido, diferentes perfis de empastamento podem ser gerados.

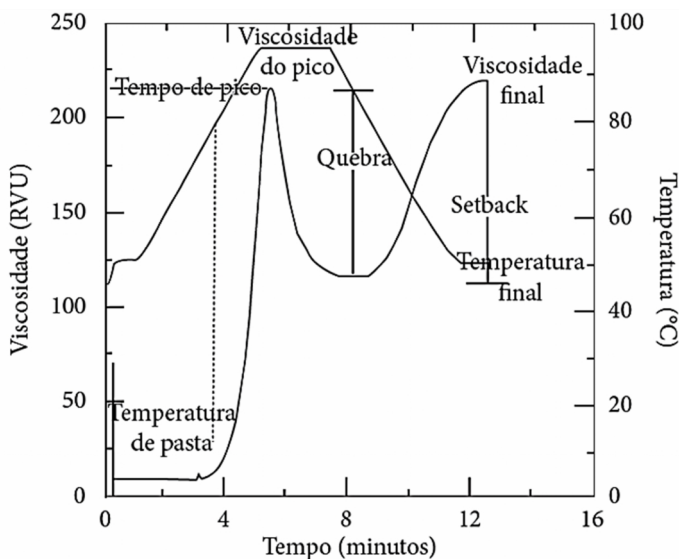


Figura 5 - Curva de viscosidade típica do RVA mostrando as variáveis comumente avaliadas.

Fonte: Newport Scientific (2010).

Durante a fase inicial de aquecimento, um aumento na viscosidade é registrado no RVA quando os grânulos começam a inchar. Neste ponto, polímeros com menor massa molecular, particularmente moléculas de amilose, começam a ser lixiviadas dos grânulos. Um pico de viscosidade é obtido durante o empastamento, quando os grânulos, em sua maioria, estão totalmente inchados, havendo também grânulos intactos e o alinhamento molecular dos polímeros solubilizados ainda não ocorreu dentro do campo de atrito do instrumento. Durante a fase de temperatura (95 °C) e agitação constantes, os grânulos começam a

quebrar, a solubilização dos polímeros continua e o alinhamento molecular ocorre dentro do campo de atrito do instrumento, causando uma diminuição da viscosidade (THOMAS & ATWELL, 1999).

2.4.3.5 Retrogradação

Com o resfriamento da pasta de amido, após sua gelatinização, as cadeias de amilose e amilopectina perdem energia e as ligações de hidrogênio tornam-se mais fortes, induzindo a associação, via ligações de hidrogênio, de moléculas de amilose, formando uma estrutura ordenada; um processo conhecido como retrogradação ou *setback*. Com o envelhecimento do gel, ou em ciclos de congelamento e descongelamento, as cadeias tendem a interagir mais fortemente entre si e, assim, expulsam a água do sistema, um fenômeno denominado sinerese (AMANTE, 1986).

As características de retrogradação da amilose e amilopectina são cineticamente diferentes. A amilose retrograda mais rapidamente, tendo forte tendência a reassociar-se via liagações de hidrogênio com outras moléculas de amilose adjacentes, formando estruturas cristalinas de duplas hélices quando do resfriamento da solução por longo período de tempo. Por outro lado, a amilopectina retrograda em uma taxa muito menor ao longo do tempo (PARKER & RING, 2001; THARANATHAN, 2002).

2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os compostos advindos do metabolismo secundário da planta, ao contrário dos compostos do metabolismo primário (carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos) não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento do indivíduo, mas podem ser imprescindíveis à sobrevivência e continuidade da espécie no ecossistema, possuindo características químicas variadas (TAIZ & ZEIGER, 2009). O metabolismo secundário vegetal tem múltiplas funções durante o ciclo de vida da planta. Tais funções podem ser classificadas como mediadores na interação das plantas com o ambiente, como planta-inseto, planta-microorganismo e interação planta-planta.

Os metabólitos secundários formam um grande reservatório de diversidade química natural, sendo que os múltiplos níveis com os quais a planta se comunica com outros organismos (e.g., competição ou sinergismo), decorrem, em alguma extensão, da variedade funcional

resultante das estruturas químicas dos metabólitos secundários. A demanda da dinâmica do ambiente confere uma plasticidade natural ao metabolismo secundário e conduz a uma evolução da diversidade genética (KUTCHAN & DIXON, 2005).

Do ponto de vista humano, os metabólitos secundários têm sido utilizados há séculos para múltiplos propósitos, e.g., drogas alucinógenas, estimulantes, antibióticos, anti-inflamatórios, pigmentos, aromatizantes, fragrâncias e inseticidas. Nos últimos anos, o interesse no metabolismo secundário vegetal é crescente, sendo que muitas pesquisas têm sido conduzidas na área da nutrição humana, principalmente tomando-se em conta que o consumo destes metabólitos poderá ter impactos positivos na prevenção de doenças como o câncer, disfunções cardiovasculares e outras patofisiologias crônicas. Neste contexto, estimular o aumento dos conteúdos de compostos secundários nos tecidos vegetais, extraí-los, identificá-los e processá-los de forma adequada tem sido um desafio constante da biotecnologia vegetal, com recursos à engenharia metabólica (AHARONI & GALILI, 2010). De acordo com a sua origem, podem ser classificados em três grandes classes, a saber: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides (HARBORNE, 1999).

A via de síntese dos metabólitos secundários está intimamente relacionada à via principal do metabolismo de carboidratos, como mostra a Figura 6. Resumidamente, dois compostos intermediários, o fosfoenolpiruvato (proveniente da via glicolítica) e a eritrose-4-fosfato (oriunda da via das pentoses-fosfato), originam o ácido chiquímico - um importante precursor de diversos compostos que possuem núcleos aromáticos. Adicionalmente, os vegetais sintetizam compostos terpenoídicos através das vias do mevalonato e de condensação do acetato. A via do mevalonato origina os terpenóides e os esteróides, enquanto a condensação do acetato resulta na formação das acetogeninas (WALTON & BROWN, 1999).

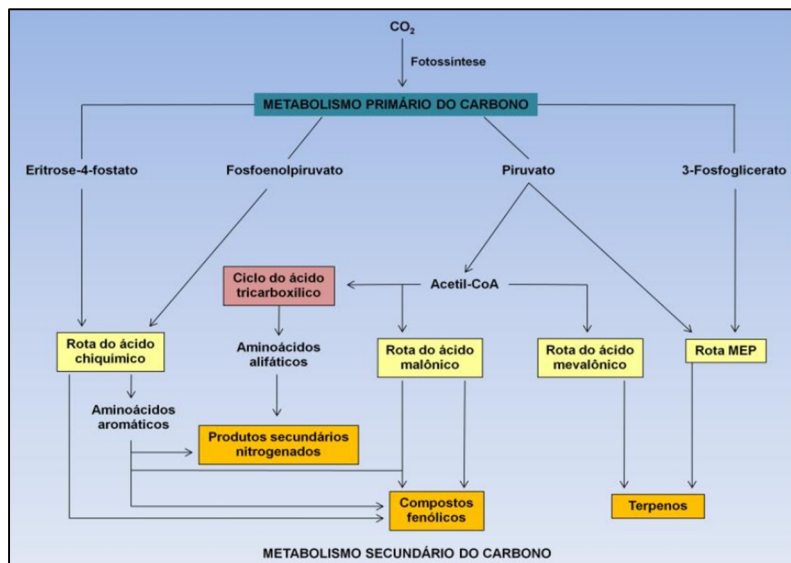


Figura 6 – Descrição simplificada das principais vias de síntese de metabólitos secundários e suas relações com o metabolismo primário.

Fonte: Taiz & Zeiger (2009).

2.5.1 Carotenoides

Os terpenos apresentam uma composição molecular básica $C_{10}H_{15}$ e estão subdivididos em subclasses em função do número de unidades de carbonos em suas estruturas, a saber: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Os carotenoides são grupos de pigmentos com mais de 600 componentes, geralmente tetraterpenoides (C_{40}), constituídos pela união de oito unidades isoprenoides (C_5), formando uma cadeia de quarenta carbonos. Nas plantas, os carotenoides participam do processo fotossintético absorvendo energia luminosa e transferindo-a aos centros de reação da clorofila (WALTON & BROWN, 1999), além de protegerem o aparato celular fotossintético contra danos foto-oxidativos (BARTLEY & SCOINIK, 1995). Esses pigmentos são sensíveis à luz, temperatura e acidez, além de serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (e.g., acetona, álcool e clorofórmio) e seus metabólitos são responsáveis por várias atividades biológicas, dando

cores a flores e frutos, atraindo polinizadores e dispersores de sementes (AMBRÓSIO *et al.*, 2006).

Existem dois grandes grupos de carotenoides de acordo com suas estruturas químicas: os chamados carotenos, que são constituídos apenas de átomos de carbono e hidrogênio, sendo, por esse motivo, moléculas altamente apolares, e as xantofilas, que são derivados oxigenados dos carotenoides, moléculas mais polares por apresentarem em suas estruturas químicas grupos funcionais como cetonas, aldeídos, epóxi e hidroxilas (Figura 7) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

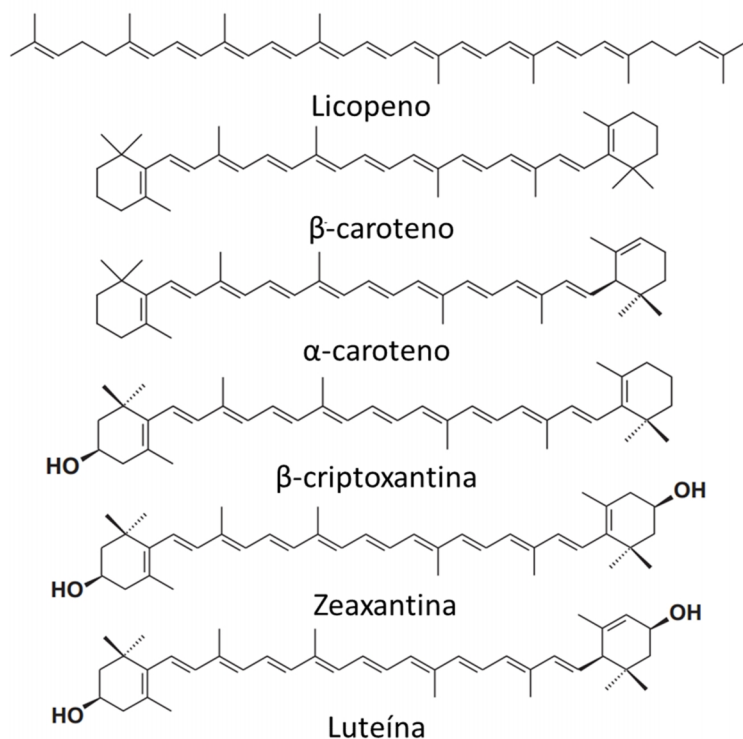


Figura 7 – Estrutura química dos principais carotenoides encontrados em raízes de *M. esculenta* Crantz.

Dos mais de 700 carotenoides conhecidos, aproximadamente 50 são precursores da vitamina A, apresentando como característica

estrutural em comum pelo menos um anel de β -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica com um mínimo de 11 carbonos. Entre os carotenoides, o β -caroteno é o mais abundante em alimentos e com maior atividade provitamina A (Figura 8). Embora aproximadamente 40 carotenoides possam ser absorvidos, metabolizados e usados pelo organismo humano, apenas 6 são usualmente detectados no plasma humano. Este grupo inclui α - e β -caroteno, licopeno, β -criptoxantina e luteína (FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2012).

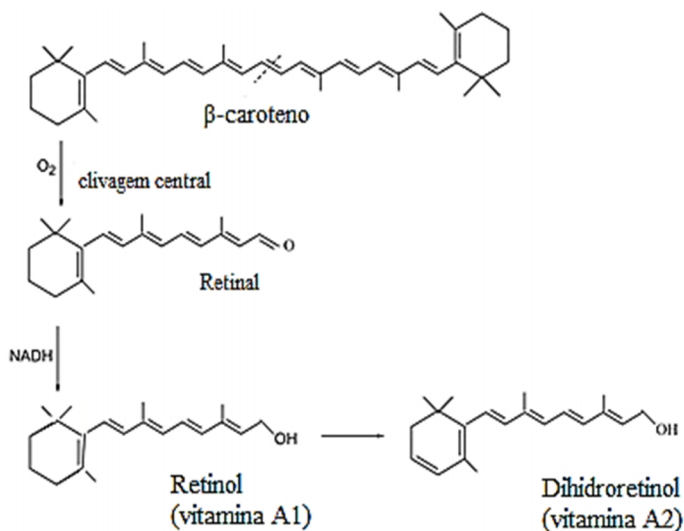


Figura 8 - Detalhe da estrutura química do β -caroteno e sua clivagem simétrica, originando o retinal, retinol (vitamina A₁) e dehidro-retinol (vitamina A₂).

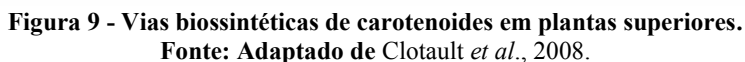
Fonte: Tapiero, Townsend & Tew (2004).

Tanto os carotenoides precursores de vitamina A quanto os não precursores, como a luteína e o licopeno, apresentam ação protetora contra o câncer. Possíveis mecanismos que explicam tal atividade referem-se ao efeito de sequestro de radicais livres, modulação do metabolismo do carcinoma, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinoides e aumento da resposta imune (AMBRÓSIO *et al.*, 2006).

2.5.2 *Manihot esculenta* como fonte de carotenoides provitamina A

Os primeiros dados de variabilidade no conteúdo de carotenoides em mandioca foram publicados por autores indianos (MOORTHY *et al.*, 1990) e brasileiros (ORTEGA-FLORES, 1991). Os valores reportados por aqueles autores não excederam a 8 µg de β-caroteno/g de raízes frescas. Iglesias *et al.*, (1997) realizaram no CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) – Colômbia, o primeiro *screening* do conteúdo de carotenoides em um banco de germoplasma mundial de mandioca. Ao analisar 632 acessos da coleção, verificaram uma significativa correlação ($r=0,82$) entre a cor da raiz e o conteúdo de carotenoides, tendo sido detectada uma ampla variação de concentração (1 µg g⁻¹ a 24 µg g⁻¹) em raízes frescas. Os cinco genótipos que apresentaram as maiores concentrações de β-caroteno foram coletados na região da floresta amazônica do Brasil e da Colômbia. Neste mesmo estudo, avaliando o potencial genético. Foi verificado que a presença de carotenoides nas raízes é determinada por dois pares de genes, sendo um responsável pelo transporte dos carotenoides às raízes e outro pelo acúmulo dos pigmentos. Estes dados são relevantes a estudos subsequentes de melhoramento genético da espécie utilizando técnicas de engenharia genética.

Recentemente, estudos de biologia molecular têm identificado os promotores específicos do armazenamento de carotenoides nas raízes. Em tecidos de plantas que exibem baixos níveis de produção de carotenoides, o fator limitante é comumente a expressão no nível da fitoeno sintetase (PHY), que catalisa a primeira reação específica da carotenogênese, formando os precursores na biossíntese de carotenóides pró-vitamina A, fitoeno e fitoflueno (CEBALLOS *et al.*, 2012). As etapas finais da via biossintética dos carotenóides, destacando a formação dos principais carotenoides, são apresentadas na Figura 9.



Além do β -caroteno, em *M. esculenta* também são encontrados outros carotenoides como a β -criptoxantina e outros sem atividade pró-vitamina A, e.g., licopeno e luteína, de reconhecidos benefícios à saúde humana, atuando principalmente como agentes antioxidantes (MONTAGNAC *et al.*, 2009).

Genótipos com concentrações consideráveis de licopeno são cultivados em pequena escala por agricultores indígenas na região amazônica. Estes genótipos originaram-se provavelmente de mutações que quebraram a sequência para a formação de β -caroteno (NASSAR *et al.*, 2007). Em raízes de mandioca com polpa de coloração rosada, o licopeno destaca-se como o carotenoide majoritário (IGLESIAS *et al.*, 1997). No Brasil, centro de origem de *M. esculenta*, devido à variabilidade genética e ao processo de domesticação ao longo dos anos, são encontrados genótipos ricos em diversos tipos de carotenoides (NASSAR *et al.*, 2007).

2.5.4 Biofortificação

Os transtornos relacionados à hipovitaminose A estão entre os principais problemas nutricionais dos países em desenvolvimento. É estimado que 190 milhões de crianças em idade pré-escolar possuam baixa atividade de retinol no plasma ($<0.70 \mu\text{mol L}^{-1}$), sintoma subclínico da deficiência. A vitamina A é um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento, funcionamento da visão e do sistema imunológico, manutenção da integridade das células epiteliais e para a reprodução (WHO, 2012). É descrita genericamente por compostos com atividade biológica de retinol, sendo encontrada em tecidos animais na forma de retinoides pré-formados (retinol, retinal e ácido retinoico) e carotenoides provitamina A, que são sintetizados e armazenados em tecidos vegetais como pigmentos acessórios à fotossíntese, protegendo a estrutura dos cloroplastos de danos oxidativos (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2001).

Três estratégias têm sido tradicionalmente usadas na prevenção da hipovitaminose A: diversificação alimentar, fortificação de alimentos e suplementação. Estas estratégias têm sido pouco efetivas e têm falhado na erradicação completa do problema em diversas populações e etnias no mundo. Recentemente, programas e instituições de pesquisas têm iniciado a implementação de uma quarta estratégia, i.e., a biofortificação, para o incremento de micronutrientes nas espécies alimentares de cultivo local, apresentando como vantagem o fato de não modificar drasticamente os hábitos alimentares das populações com deficiências nutricionais. O objetivo da biofortificação é buscar alimentos mais nutritivos, mas que também tenham boas condições agronômicas e boa aceitação no mercado (CEBALLOS *et al.*, 2012).

Da mesma maneira, não se espera que a biofortificação venha a tratar completamente ou eliminar a deficiência de micronutrientes em todos os grupos populacionais. Usualmente, uma intervenção isolada não resolve o problema da desnutrição de micronutrientes, mas a biofortificação complementa as intervenções existentes, colaborando por aumentar a adequação diária de ingestão de micronutrientes às populações mais vulneráveis (SALTZMAN *et al.*, 2013).

A biofortificação oferece um meio viável para atingir populações rurais mal nutridas, que podem ter acesso limitado às dietas diversificadas, suplementos e alimentos fortificados comercialmente. A principal estratégia consiste em aumentar os teores de micronutrientes em alimentos que já são da preferência agrônômica e de consumo das populações. A etapa inicial consiste na identificação de linhagens de genótipos, preservados por estas populações e/ou mantidos em bancos de germoplasma, com teores superiores de metabólitos-alvo, para que possam ser explorados via melhoramento genético (SALTZMAN *et al.*, 2013).

2.5.4.1 Biofortificação de *Manihot esculenta*

A mandioca é considerada um alimento tradicional para muitas populações com risco de deficiência de vitamina A, sendo produzida predominantemente em pequena escala por agricultores com recursos limitados. Na mandioca, o β -caroteno é o carotenoide majoritário com atividade provitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010), porém, concentrações de carotenoides em raízes de mandiocas tipicamente brancas (mais comumente encontradas nestas populações) são baixas, i.e., $\sim 1 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco e $3 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco (IGLESIAS *et al.*, 1997). Sabe-se, contudo, que a coloração amarela de suas raízes apresenta alta correlação com o teor de carotenoides totais e na busca por genótipos com maior atividade pró-vitamina A, valores superiores a $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de β -caroteno/g de peso fresco têm sido encontrados (CHAVEZ *et al.*, 2005).

O progresso em incrementar o conteúdo de carotenoides nas raízes de mandioca foi significativo nos últimos anos. Níveis máximos de carotenoides totais foram reportados por Montagnac *et al.* (2009) em mandioca biofortificada ($20 \mu\text{g g}^{-1}$), e por Sánchez *et al.* (2010), ($25 \mu\text{g g}^{-1}$ de raízes frescas).

Considerando a elevada ingestão diária de mandioca em vários países africanos (FAO, 2006), a mandioca biofortificada com altos

teores de β -caroteno poderia prontamente afetar a prevalência de cegueira noturna e a hipovitaminose A em mulheres, se amplamente adotada (WHO, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 – O impacto de mandioca biofortificada com 2 mg de β -caroteno/100g de peso fresco na ingestão de Vitamina A em países africanos. Considerando que o requerimento médio para mulheres é de 485 μ g/d, a mandioca biofortificada apresenta impacto positivo na prevenção de cegueira noturna.

País	Prevalência de cegueira noturna ^a	Consumo (g/dia) ^b	Conteúdo de β -Caroteno (mg)	Retenção de β -Caroteno ^c	Estimativa de Retinol Equivalente ^d (μ g)
Congo	5,4% a 9,5%	820	16,4	10,8	900 a 1800
Moçambique	1,6% a 8,2%	680	13,6	9,0	750 a 1500
Ghana	4,6% a 12,8%	600	12	7,9	660 a 1300
Benin	4,1% a 14,7%	430	8,6	5,7	480 a 950
Guinea	7,9% a 21,3%	360	7,2	4,8	400 a 800
Ruanda	4,8% a 11,5%	350	7	4,6	380 a 770
Madagascar	1,7% a 15,3%	320	6,4	4,2	350 a 700
Nigéria	4,9% a 11,1%	310	6,2	4,1	340 a 680

^a conteúdo de prevalência em diferentes comunidades com cegueira noturna (uma séria sequela da deficiência de vitamina A) em mulheres e crianças em idade escolar (WHO <http://www.who.int/vmnis/vitamina/data/database/countries/en/index.html>)

^bFAOSTAT agricultural data base Roma, Italy: FAO <http://faostat.fao.org/site/609/default.aspx#ancor>.

^cUm fator de retenção de 66% foi usado, conforme reportado para mandioca cozida (IGLESIAS *et al.*, 1997).

^d Estimativas de retinol equivalente foram calculadas usando fatores de conversão de 6 μ g de β -caroteno (FAO/WHO 2002) e 12 μ g de β -caroteno para 1 μ g de retinol (Institute of Medicine – IOM, 2001) para envolver as variações de predição da equivalência.

Fonte: Montagnac, Davis & Tanumihardjo (2009).

Pesquisas exploratórias realizadas pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) identificaram, na América do Sul, fontes de germoplasma com altos teores de carotenoides. A partir desses genótipos variedades adaptadas ao ambiente africano foram obtidas, inclusive resistentes ao vírus do mosaico da mandioca, e lançadas na Nigéria, em 2011. Estas variedades apresentam atividade provitamina A suficiente para proporcionar aproximadamente 25% de atividade

equivalente de retinol (RAE) em mulheres e crianças com idade escolar, naquela região (SALTZMAN *et al.*, 2013).

Welsch *et al.* (2010) mostraram, através de plantas de mandioca modificadas geneticamente, que a superexpressão de genes *PHY* favorece o fluxo de carbono à carotenogênese. Utilizando genótipos de raízes brancas ($0,65 \pm 0,06 \mu\text{g. g}^{-1}$ de carotenoides), foi demonstrado que plantas *PHY* mutantes produziam raízes de polpa amarela, com concentrações de carotenoides superiores ao controle ($21,84 \pm 0,84 \mu\text{g. g}^{-1}$) (Figura 10).

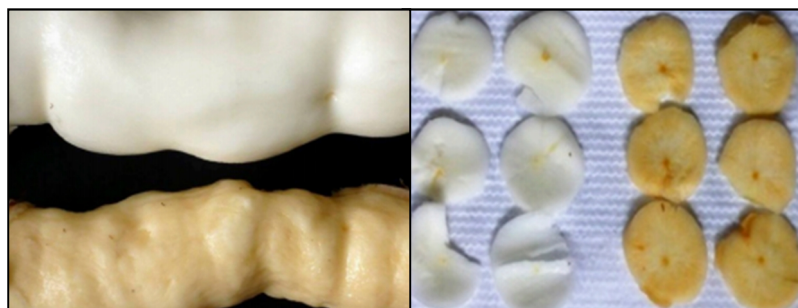


Figura 10 – A superexpressão do gene *PHY* é suficiente para favorecer a acumulação de carotenoides em raízes de mandioca. Teores de carotenoides totais nas raízes brancas (*wild-Type*) são de $0,65 \pm 0,06$ (base em peso seco) e $21,84 \pm 0,84 \mu\text{g.g}^{-1}$ nos mutantes (coloração amarela).

Fonte: Welsch *et al.*, 2010.

2.5.5 Retenção de carotenoides em raízes de mandioca

Para minimizar as consequências da hipovitaminose A em casos aonde a mandioca é um importante componente alimentar, é necessário que os carotenoides presentes nas raízes consumidas sejam absorvidos e eficientemente transformados em vitamina A. Portanto, a estabilidade dos carotenoides em raízes de mandioca submetidos a métodos de processamento deve ser considerada. O aumento da área superficial por cortar, ralar ou triturar, a exposição à luz, oxigênio e altas temperaturas colaboram à degradação dos compostos carotenóidicos presentes naquela matriz. A retenção é um importante componente para definir o conteúdo final de carotenoides nas raízes de mandioca que serão consumidas (CHAVÉZ *et al.*, 2007), sendo calculada em termos

relativos (%) com o auxílio da equação (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004):

$$\text{Retenção (\%)} = \frac{\text{conteúdo de carotenoides por g de alimento processado}}{\text{conteúdo de carotenóides por g de alimento cru}} * 100$$

Ceballos *et al.* (2012) analisaram a retenção de carotenoides em raízes de seis clones de mandioca submetidas ao cozimento em água em ebulição. A média de retenção situou-se em torno de 86,6%, com amplitude de variação de 76 a 96,7% (base em peso seco). Resultados anteriores obtidos por Chávez *et al.* (2007), também com raízes submetidas ao processo de fervura por 30 minutos apresentaram 55,7% de retenção, com amplitude de variação de 27,2 a 82,8% (base em peso seco). Este estudo avaliou ainda a retenção de carotenoides em raízes de mandioca submetidas à secagem em estufa (60°C/24 horas), secagem ao sol (2-3 dias), secagem à sombra (6-7 dias) e à preparação do Gari (método popular de processamento e consumo de farinha de mandioca no oeste da África). O processo de secagem na estufa permitiu a retenção de maiores conteúdos de β -caroteno (71,9%), seguido de secagem à sombra (59,2%), água em ebulição (55,7%), secagem ao sol (37,9%) e produção do Gari (34,1%). A drástica redução na retenção de β -caroteno na secagem ao sol, comparativamente à secagem à sombra, sugere um efeito significativo prejudicial da luz na estabilidade daquele pigmento. Gari apresentou a mais baixa retenção, devido ao longo tempo requerido na sua fase fermentativa. Altos valores de retenção em mandioca desidratadas ao forno sugerem uma estratégia alternativa à indústria de alimentos, i.e., a produção de *chips* com características funcionais de interesse à saúde humana, devido aos altos teores de compostos retidos na matriz alimentícia.

2.5.6 Biodisponibilidade e isomerização de carotenoides em mandioca

Embora a concentração de carotenoides totais decresça com o processamento das raízes de mandioca, é entendido que o processamento dos alimentos rompe as membranas e paredes celulares e desnatura proteínas complexadas com os carotenoides, facilitando um maior acesso das enzimas digestivas e a liberação e incorporação daqueles pigmentos em micelas mistas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Hedren *et al.* (2002), por exemplo, observaram que a eficiência de micelarização do β -caroteno durante a simulação de digestão *in vitro* foi de 3% em raízes de cenouras cruas, alcançando 27% em raízes cozidas. Thakkar *et al.* (2007), constataram que o grau relativo de micelarização em raízes de mandioca em ensaios *in vitro* foi superior ao relatado a outras espécies vegetais, e.g., cenoura, tomate, espinafre e abóbora. Howe *et al.* (2009) estudaram a bioconversão de β -caroteno em raízes de mandiocas processadas, comparando a eficácia com suplementos de vitamina A e β -caroteno, usando roedores (*Meriones unguiculatus*). Este estudo confirmou que carotenoides provitamina A em mandioca são tão biodisponíveis quanto suplementos de β -caroteno em uma dieta depletada de vitamina A. Além disso, os resultados indicaram que o *cis*- β -caroteno pode ter uma bioeficácia maior do que a atribuída à sua atividade pró-vitamina A. Portanto, baseado na recente evidência que o *cis*- β -caroteno é eficientemente convertido à vitamina A, a quantificação dessas isoformas, em adição ao *trans*- β -caroteno deve ser considerada.

2.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura um ou mais anéis benzênicos, com um ou mais grupamentos hidroxilas como substituintes. Constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos conhecidos até o momento. Devido à sua significativa diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais, e.g., compostos de defesa contra herbívoros e patógenos, atrativos de polinizadores, dispersores de frutos, a proteção à radiação ultravioleta, suporte mecânico, ou ainda reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes - alelopatia (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos são biossintetizados por diversas rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na biossíntese destes metabólitos: as rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico, conforme descrito na Figura 11. A rota do ácido chiquímico responde pela síntese da maioria dos compostos fenólicos vegetais, sendo a rota do ácido malônico menos significativa nas plantas superiores (TAIZ & ZEIGER, 2009).

susceptibilidade à deterioração (REILLY *et al.*, 2003). Apesar deste potencial, constata-se um reduzido número de trabalhos científicos de caracterização da composição fenólica em raízes de mandioca designadas ao consumo humano.

Estudos de caracterização da composição destes metabólitos secundários poderão gerar eventualmente um novo cenário de uso dessa espécie, com vistas às suas propriedades nutraceuticas, bem como de aumento de valor agregado a seus produtos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as características físico-químicas, morfológicas e funcionais da fração amídica e caracterizar o perfil carotenóidico e fenólico de raízes de genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair a fração amídica e determinar a concentração de amilose e amilopectina dos genótipos em estudo;
- Analisar a morfologia e o diâmetro dos grânulos de amido via microscopia eletrônica de varredura (MEV) e
- Determinar o índice de cristalinidade dos grânulos de amido por difração de Raio-X (DRX);
- Determinar a densidade absoluta e a capacidade de adsorção lipídica e de água dos grânulos de amido,
- Caracterizar a fração amídica (amilose e amilopectina) por Espectroscopia Vibracional de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR);
- Quantificar as variáveis reológicas poder de inchamento, viscosidade máxima, viscosidade mínima, viscosidade final no ciclo de resfriamento e a tendência à retrogradação dos amidos dos genótipos estudados;
- Determinar a concentração de carotenoides totais em amostras de raízes frescas e cozidas dos genótipos de mandioca via espectrofotometria UV-visível e avaliar a influência do processo de cozimento na retenção de carotenoides em raízes de mandioca.
- Caracterizar o perfil carotenóidico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e subsequente construção de modelo descritivo via análise de componentes principais (PCAs).
- Determinar a concentração de compostos fenólicos totais via espectrofotometria UV-visível e caracterizar o perfil de compostos fenólicos por CLAE
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos metanólicos das raízes dos genótipos estudados.

- Desenvolver, através de ferramentas de bioinformática e quimiometria, protocolos de análises do metaboloma de *M. esculenta*, que possibilitem a geração de uma ferramenta de discriminação eficiente para determinar a variabilidade química, auxiliando na identificação e seleção de genótipos de interesse, no contexto bioquímico.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, A., GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 1-6, 2010.

ALLEM, A. C. The closest wild relatives of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). **Euphytica**, v. 107, p. 123–133, 1999.

AMBRÓSIO, C.L.B., CAMPOS, F.A.C.S., FARO, Z.P. Carotenoides como alternativa contra hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 233-243, 2006.

AMANTE, E.R. Caracterização de amidos de variedades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) e da batata doce (*Ipomoea batatas*). Dissertação. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Viçosa, Minas Gerais. Brasil, 1986.

AUCLAIR, S., MILENKOVIC, D., BESSON, C., CHAUVET, S., GUEUX, E., MORAND, C., MAZUR, A., SCALBERT, A. Catechin reduces atherosclerotic lesion development in apo E-deficient mice: A transcriptomic study. **Atherosclerosis**, v. 204, p. 21–27, 2009.

BARTLEY, G.E., SCOINIK, P.A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual, attraction, and human health. **Plant Cell**, v. 7, p. 1027-1038, 1995.

BEHALL, K.M., SCHOLFIELD, D.J. Food amylose content affects postprandial glucose and insulin responses. **Cereal Chemistry**, v. 82, p. 654-659, 2005.

BEMILLER, J, N. Starch modification: challenges and prospects. **Starch/Stärke**, v.49, p.127-131, 1997.

BAYOUMI, S. A. L., ROWAN, M. G., BEECHING, J. R., BLAGBROUGH, I. S. Constituents and secondary metabolite natural

products in fresh and deteriorated cassava roots. **Phytochemistry**, v. 71, p. 598–604, 2010.

BLAGBROUGH, I.S.; BAYOUMI, S.L.A.; ROWAN, M.G.; BEECHING, J.R. Cassava: an appraisal of its phytochemistry and its biotechnological prospects. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1940–1951, 2010.

BOLHUIS, G.G. The toxicity of cassava roots. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.2, p.176-185, 1954.

BUSCHMANN, H., REILLY, K., RODRIGUEZ, M. X., TOHME, J., BEECHING, J. R. Hydrogen peroxide and flavan-3-ols in storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) during postharvest deterioration. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 5522–5529, 2000a.

BUSCHMANN, H., RODRIGUEZ, M. X., TOHME, J., BEECHING, J. R. Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v. 86, p. 1153-1160, 2000b.

BURNEY PG, COMSTOCK GW, MORRIS JS. Serologic precursors of cancer: serum micronutrients and the subsequent risk of pancreatic cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p. 895–900, 1989.

CARDOSO, E. L.; SOUZA, J. S. Importância, potencialidades e perspectivas do cultivo da mandioca na América Latina. In: CEREDA, M. P. (Coord.). Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas. São Paulo: Fundação Cargill (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), v.1, p. 29-47, 2002.

CARVALHO, M.; JERÓNIMO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SILVA, B.M. Green tea: A promising anticancer agent for renal cell carcinoma. **Food Chemistry**, v. 122, p. 49–54, 2010.

CEBALLOS, H.; LUNA, J.; ESCOBAR, A.F.; ORTIZ, D.; PÉREZ, J.C.; SÁNCHEZ, T.; PACHÓN, H.; DUFOUR, D. Spatial distribution of dry matter in yellow fleshed cassava roots and its influence on carotenoid retention upon boiling. **Food Research International**, v. 45, p. 52–59, 2012.

CEREDA, M. P., FRANCO, C. M. L., DAIUTO, E. R., DEMIATE, I. M., CARVALHO, L. J. C. B., LEONEL, M. Propriedades gerais do amido. Serie: culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas, v. 1. São Paulo, Brasil: Fundação Cargill, 2001.

CHAMPAGNE, A., BERNILLON, S., MOING, A., ROLIN, D., LEGENDRE, L., LEBOT, V. Carotenoid profiling of tropical root crop chemotypes from Vanuatu, South Pacific. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 763–771, 2010.

CHANDER, V.; SINGH, D.; CHOPRA, K. Catechin, a natural antioxidant protects against rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 503–509, 2003.

CHAVÉZ, A.L; SÁNCHEZ, T.; CEBALLOS, H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; NESTEL, P.; TOHME, J.; ISHITANI, M. Retention of carotenoids in cassava roots submitted to different processing methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 388–393, 2007.

CLOTAULT, J., PELTIER, D., BERRUYER, R., THOMAS, M., BRIARD, M., GEOFFRIAU, E. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3563–3573, 2008.

DAIUTO, E. R.; CEREDA, M. P. Processos de produção de fécula de mandioca: comparação Tailândia e China. In CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas**

amiláceas latino- americanas, São Paulo: Fundação Cargill, p. 178 (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas, v. 3), 2004.

DEMIATE, I. M. WOSIACK, G.; CEREDA, M. P.; MESTRES, C. Viscographic characteristics of chemically modified cassava starches assessed by RVA. **Publicatio UEPG**, v. 11, p.7-17, 2005.

DI STASI L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI (Coord.). *Plantas medicinais: arte e ciência – Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, p. 109 – 127, 1996.

DONALD, A.M., WAIGH, T.A., JENKINS, P.J., GIDLEY, M.J., DEBET, M., SMITH, A. Internal structure of starch granules revealed by scattering studies. In: FRAZIER, P.J., DONALD, A.M., RICHMOND, P. (Eds.), *Starch: Structure and Functionality*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 172–179, 1997.

ELIAS, M.; MUHLEN, G. S.; McKEY, D.; ROA, A. C.; TOHME, J. Genetic diversity of traditional south american landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**, v. 58, p. 242-256, 2004.

ELIASSON, A.C. **Starch in Food – Structure, Function and Applications**. New York: Boca Raton, CRC, 2004.

ELIASSON, A. N., GUDMUNDSSON, M. Starch: Physicochemical and Functional Aspects. In ELIASSON, A. N. (ed.) **Carbohydrates in Food**, v. 2, p 391-469, 2006.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Rome, Italy. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/>. Acesso em: 08/06/2013.

FAO. FAOSTAT agricultural data [database]. Rome, Italy: FAO, 2006. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/609/default.aspx#ancor>. Acesso em: 08/06/2013.

FAO/WHO. 2002. Human vitamin and mineral requirements. Chapter 7, Vitamin A. Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2809E/y2809e00.htm#Contents>. Acesso em: 08/06/2013.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CARVAJAL-LÉRIDA, I., JARÉN-GALÁN, M., GARRIDO-FERNÁNDEZ, J., PÉREZ-GÁLVEZ, A., HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, p. 438–450, 2012.

FRANCESCHI S, BIDOLI E, LA VECCHIA C, TALAMINI R, D'AVANZO B, NEGRI E. Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. **International Journal of Cancer**; v. 4, p. 59:181, 1994.

FRANCO, C. M. L., CIACCO C. F., TAVARES, D. Q. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part II. Study of the granular structure of starch. **Starch/Stärke**, v. 40, p. 29–32, 1988.

FRANCO, C. M. L.; DEMIATE, I. M.; ROCHA, T. S. Características estruturais e físico químicas de amidos de mandioca-salsa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.3, p. 620-628, 2008.

FRANCO, C. M. L. DAINTO, E.R; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L. J. C; LEONEL, M; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O.F; SARMENTO, S. B.S. **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Propriedades Gerais do Amido**. Campinas: Fundação Cargill, 2002.

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Sistemas de produção, 2003.

FUKUDA W.M.G.; PEREIRA, M. E. C. BRS Rosada – Mandioca de mesa com raiz colorida e mais nutritiva. Folder BRS Rosada - Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, Bahia, 2006.

GALLANT, D. J., BEWA, H., BUY, Q. M., BOUCHET, B., SZYLIT, O., & SEALY, L. On the ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. **Starch/Stärke**, v. 30, p. 255–262, 1982.

GALLIARD, J., BOWLER, P. Morphology and composition of starch. In: GALLARD, D. T., ed. **Starch properties and potential**. Chichester: Willey, p. 55-78, 1987.

GOMAND, S.V.; LAMBERTS, L.; VISSER, R.G.F.; DELCOR, J.A. Physicochemical properties of potato and cassava starches and their mutants in relation to their structural properties. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 424-433, 2010.

HARBORNE, J.B. Classes and functions of secondary products. In: WALTON, N.J.; BROWN, D. (Eds). **Chemicals from plants, perspectives on secondary products plant products**. Imperial College Press. p.1-25, 1999.

HEDREN, E.; DIAZ, V.; SVANBERG, U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 425–430, 2002.

HIGGINS, J.A.; HIGBEE, D.R.; DONAHOO, W.T.; BROWN, I.L.; BELL, M.L.; BESSESEN, D.H. Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. **Nutritional Metabolism**, v. 1, p. 1-11, 2004.

HOSENEY, R. C. Principles of Cereal Science and Technology, AACC Inc, St. Paul, Minesota, USA, 1986.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 253-267, 2001.

HOULT, J. R. S., PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple cou-marins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, p. 713-722, 1996.

HOWE, J.A.; MAZIYA-DIXON, B.; TANUMIHARDJO, S.A.. Cassava with enhanced β -carotene maintains adequate vitamin A status in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) despite substantial cis-isomer content. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 342-349, 2009.

HU, G.; BURTON, C.; YANG, C. Efficient measurement of amylose content in cereal grains. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 35-40, 2010.

HUGHES, D. A. Dietary carotenoids and human immune function. **Nutrition**, v. 17, p. 823–827, 2001

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Produção Agrícola Municipal, 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2011/PAM2011_Publicacao_completa.pdf. Acesso em: 04/02/2013.

IGLESIAS, C.; MAYER, J.; CHAVEZ, L.; CALLE, F. Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. **Euphytica**, v. 94, p. 367–373, 1997.

ILLIC, D., MISSO, M. Lycopene for the prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: A systematic review. **Maturitas**, v. 72, p. 269–276, 2012.

IOM, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: Natl. Academy Press. p. 65–126, 2001.

JANE, J., KASEMSUWAM, T., LEAS, S., ZOBEL, H., IL, D., ROBYT, F. Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. **Starch/Stärke**, v. 46, p. 121-129, 1994.

KIM, Y.S.; WIESENBERN, D.P.; ORR, P.H.; GRANT, L.A. Screening potato starch for novel properties using differential scanning calorimetry. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 1060-1065, 1995.

KOHLMEIER, L., KARK, J. D., GOMEZ-GARCIA, E., MARTIN, B. C., STECK, S. E., KARDINAAL, A. F. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study. **American Journal of Epidemiology**, v. 26, p. 146-618, 1997.

KUHNEN, S. Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho. Tese. Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. Brasil, 2007.

KUTCHAN, T.; DIXON, R.A. Physiology and metabolism. Secondary metabolism: nature 's chemical reservoir under deconvolution. **Current Opinion in Biotechnology** v. 8, 227-229, 2005.

LEACH, H.W., MCCOWEN, L.D., SCHOCH, T.J. Structure of the starch granule I. Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, v. 36, p. 534-544, 1959.

LEWIS, M.J. **Propriedades Físicas de los Alimentos y de los Sistemas de Processado**. Acribia. Zaragoza, 1993.

LIAN, F., HU, K. Q., RUSSELL, R. M., & WANG, X. D. β -Cryptoxanthin suppresses the growth of immortalized human bronchial

epithelial cells and non-small-cell lung cancer cells and up-regulates retinoic acid receptor beta expression. **International Journal of Cancer**, v. 119, p. 2084–2089, 2006.

LIU, Q. Understanding starches and their role in foods. In: CUI, S. W. (ed). **Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications**. Boca Raton : CRC Press, p. 309-305, 2005.

MARCON, M.J.A., AVANCINI, S.R.P., AMANTE, E.R. **Propriedades Químicas e Tecnológicas do Amido de Mandioca e do Polvilho Azedo**. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil, 2007.

MATSUGUMA, L.S. Caracterização do amido de mandioquinha salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) nativo e modificado por oxidação. Dissertação. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Brasil, 2006.

MONTAGNAC, J.A.; DAVIS, C.R.; TANUMIHARDJO, S.A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p 181–194, 2009.

MORRISON, R.T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 13. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 1335-1339, 1996.

MOORTHY, S. N. Effect of different types of surfactants on cassava starch properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 1227–1232, 1985.

MOORTHY, S. N.; JOS, J.S.; NAIR, R.B.; SREEKUMARI, M.T. Variability of β -carotene content in cassava germplasm. **Food Chemistry**, v. 36, p. 233–236, 1990.

MUELLER, R. L. First-generation agents: aspirin, heparin and coumarins. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 17, p. 23–53, 2004.

NASSAR, N., ORTIZ, R. Melhorar a mandioca e alimentar os pobres. **Scientific American Brasil**, p. 72-77, 2010.

NASSAR, N., VIZZOTTO, C.S., SCHWARTZ, C.A., PIRES, O.R. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 116–121, 2007.

NASSAR, N, M, A.; HASHIMOTO, D. Y. C.; FERNANDES, S. D.C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 16-28, 2008.

NAVARRO, A.S.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Modelling of reological behaviour in starch-lipid systems. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technolog**, v. 29, p. 632-639, 1996.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger. Princípios de Bioquímica**, Quarta edição. Artmed Editora S.A. Porto Alegre. Brasil, 2011.

NEWPORT SCIENTIFIC. Applications manual for the rapid visco analyser. Warriewood, Austrália, 2010.

NISHI, K., MURANAKA, A., NISHIMOTO, S., KADOTA, A., SUGAHARA, T. Immunostimulatory effect of β -cryptoxanthin in vitro and in vivo. **Journal of functional foods**, v. 4, p. 618 –625, 2012.

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v.56, p. 517-526, 2004.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 5586–5591, 1999.

ORTEGA-FLORES, C.I. Carotenóides com atividade pró-vitâmica A e teores de cianeto em diferentes cultivadores de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1991.

PALOZZA, P. Can β -carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1740: p. 215– 221, 2005.

PARKER, R.; RING, S.G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v.34, p.1-17, 2001.

PÉREZ, S., BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch/Stärke**, v. 62, p. 389–420, 2010.

RATNAYAKE, W.S.; JACKSON, D.S. Gelatinization and solubility of corn starch during heating in excess water: New insights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3712-3716, 2006.

REILLY, K., GÓMEZ-VÁSQUEZ, R., BUSCHMANN, H., TOHME, J., BEECHING, J.R. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. **Plant Molecular Biology**. v. 53, p. 669–685, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. OMNI Research, Washington, D. C., 2001.

RODRIGUES-AMAYA, D. B. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. – Brasília: MMA, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 726-740, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA D.B.; KIMURA M., HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2. HarvestPlus, Washington, DC, e Cali, International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2004.

ROGER, D.J; APPAN, S.G; Manihot and Manohotoides (Euphorbiaceae). **Flora Neotropcs**.v.13, p.1-272, 1973.

ROSENTHAL, F. R. T., NAKAMURA, T., ESPINDOLA, A. M. C., & JOCHIMEK, M. R. Structure of starch granules. **Die Stärke**, v. 26, p. 50–55, 1974.

SALIJATA, M. G. SINGHAL, R. S. KULKARNI, P. R. Resistant Starch – A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 1-17, 2006.

SALTZMAN, A., BIROL, E., BOUIS, H.E., BOY, E., MOURA, F. F., ISLAM, Y., PFEIFFER. W. H., Biofortification: Progress toward a more nourishing future. **Global Food Security**, v. 2, p. 9-17, 2013.

SÁNCHEZ, T.; ORTIZ, D.; MORANTE, N.; CEBALLOS, H.; PACHON, H.; CAL LE, F.; PEREZ, J. C. New approaches for quantifying carotenoids content in cassava roots. 11th Triennial Symposium. African Branch. Kinshasa, D.R. Congo: International Society for Tropical Root crops, p. 4– 8, 2010.

SCOTT, K. J., RODRIQUEZ-AMAYA, D. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents - fact or fiction? **Food Chemistry**, v. 69, p. 125-127, 2000.

SILVA, R. M. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas. São Paulo: Fundação Cargill (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), v. 1, p. 13-56, 2002.

SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SODHI, N. S., GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. Review. **Food Chemistry**, v. 81, p. 219-231, 2003.

SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 10, n. 1, p. 24-30, 2000.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 345-351, 2003.

SWINKELS, J. J. M. Composition and properties of commercial native starches. **Starch/Stärke**, v.37, p. 1-5, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre, Editora Artmed, 4ª. ed., 2009.

THAKKAR SK, MAZIYA-DIXON B, DIXON AG, FAILLA ML. Beta-carotene micellarization during *in vitro* digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to beta-carotene content in different genotypes of cassava. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2229-2233, 2007.

TAPIERO, H., TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 100–110, 2004.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p. 151-165, 2004.

TESTER, R.F.; MORRISON, W.R. Swelling and gelatinization of cereal starches. Effects of amylopectin, amylose and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 551-557, 1990.

THARANATHAN, R.N. Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 65-84, 2002.

THAPA, D., GHOSH, R. Antioxidants for prostate cancer chemoprevention: Challenges and opportunities. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 1319–1330, 2012.

THOMAS, D. J., ATWELL, W. **Practical for Guides the Food Industry-** Starch Saint Paul: Eagan Press, 1999.

VANEENWYK J, DAVIS FG, BOWEN PE. Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal Cancer**, v. 8, p. 34–48, 1991.

YAMAGUCHI, M. β -Cryptoxanthin and bone metabolism: The preventive role in osteoporosis. **Journal of Health Science**, v. 54, p. 356–369, 2008.

WANG, M., JIAO, J., LI, Z., LIU, R., SHI, Q., MA, L. Lutein supplementation reduces plasma lipid peroxidation and C-reactive protein in healthy nonsmokers. **Atherosclerosis**, v. 227, p. 380-385, 2013.

WALTON, N.J., BROWN, D.E. **Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products**. London, 425 p., 1999.

WEI, M. L., GIOVANNUCCI, E. L. Lycopene, tomato products, and prostate cancer incidence: a review and reassessment in the PSA screening era. **Journal of Oncology**, v. 27, p. 10-63, 2012.

WELSCH, R., ARANGO, J., BÄR, B., SALAZAR, B., AL-BABILI, S., BELTRÁN, J., CHAVARRIAGA, P., CEBALLOS, H., TOHME, J., BEYER, P. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. **The Plant Cell**, v. 22, p. 3348–3356, 2010.

WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. San Diego: Academia Press, 1997.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Carboidratos, In: FENNEMA O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza, Acirbia, p. 81-156, 1993.

WHO. (World Health Organization Global) Prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global Database on Vitamin A deficiency. Geneva, 2012.

WHO. Vitamin A deficiency data by country, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/vmnis/vitamina/data/database/countries/en/index.html>. Acesso em: 08/06/2013.

YAO, L. H., JIANG, Y. M., SHI, J.; TOMAS-BARBER AN, F. A., DATTA, N., SINGANUSONG, R., CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113–122, 2004.

ZOBEL, H. F. X-ray analysis of starch granules. In Whistler, R. L. (ed.). **Methods in Carbohydrates Chemistry**, v. 4, p. 109-143, 1964.

ZOBEL, H. F., YOUNG, S. N.; ROCCA, L. A. Starch gelatinization: An X-ray diffraction study. **Cereal Chemistry**, v. 65, p. 443–446, 1988.

ZUANAZZI, J. A. S. MONTANHA, J. A.; S. C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P. M., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 6ª ed., p. 577-614, 2007.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPRIEDADES VISCOAMILOGRÁFICAS DE AMIDOS DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) ocupa atualmente a posição da terceira cultura mais importante como fonte de calorias do mundo, dentre o grupo das culturas alimentícias básicas, que inclui o arroz e o milho (FAO, 2012). A parte mais importante da planta é a raiz, rica em fécula, i.e. amido, utilizada na alimentação humana e animal ou como matéria-prima para diversas indústrias.

A fração amídica é formada basicamente por dois polissacarídeos, i.e., amilose (formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α - (1, 4), originando uma cadeia linear (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004; LIU, 2005)) e amilopectina (formada por unidades de glicose unidas em α - (1, 4) com pontos de ramificações α - (1,6), formando uma estrutura ramificada (WALTER, SILVA & EMANUELLI, 2005)) sendo a relação de conteúdos destas duas macromoléculas variável de acordo com a fonte botânica e até mesmo entre genótipos de uma mesma espécie, o que irá determinar características específicas à pasta de amido (CEREDA *et al.*, 2001). Amilose e amilopectina diferem quanto ao grau de hidratação e ao comportamento hidrotérmico sob aquecimento, evidenciando propriedades funcionais peculiares aos diversos tipos de amidos de interesse industrial (CEREDA *et al.*, 2001).

Para atender às exigências do mercado consumidor é necessário caracterizar o amido, o que envolve um grande número de determinações analíticas. A análise dos resultados obtidos, o modo como as características avaliadas se correlacionam e a explicação para tais fatos ainda é objeto frequente de estudos, visando uma maior exploração das potencialidades desta biomassa. Além disto, estudos que visam à caracterização estrutural de polissacarídeos (fração amídica) podem servir futuramente para a rápida identificação de genótipos de mandioca, ou como um marcador bioquímico para avaliação da diversidade química entre genótipos e ao melhoramento genético assistido. Tal aspecto é de interesse, haja vista que grande parte do amido nativo tem uso limitado na indústria por não possuir as propriedades funcionais necessárias. Tais características evidenciam a

importância de pesquisas de caracterização das biomassas de genótipos de *M. esculenta*, subsidiando o desenvolvimento de novas aplicações da matéria-prima dessa espécie junto às indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, por exemplo.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), através da Estação Experimental de Urussanga, situada no Sul do Brasil, mantém um banco de germoplasma de mandioca com acessos genéticos oriundos de outras instituições de pesquisa do Brasil e internacionais para apoio ao seu programa de melhoramento genético de mandioca. Além destes, a empresa agregou em torno de duzentos acessos de mandioca de mesa especificamente, oriundos de coletas realizadas por seu grupo de pesquisa em diversas localidades do Estado de Santa Catarina que estavam sendo mantidos “*on farm*” por pequenos produtores familiares. Esta coleção de trabalho ao longo dos últimos anos tem sido avaliada baseada em parâmetros eminentemente morfofisiológicos e agrônômicos. Contudo, destaca-se a quase total escassez de informações sobre a composição química e o valor nutricional destes genótipos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é iniciar um estudo de caracterização metabólica, com ênfase inicial na composição amídica de dez genótipos depositados neste banco germoplasma. Afere-se que haja diversidade química entre os genótipos de *M. esculenta* estudados, indicando uma constituição amídica distinta e consequentemente propriedades físico-químicas e funcionais diferentes àquelas biomassas. Neste estudo, análises de componentes principais (PCAs) e clusters foram usados, objetivando a construção de modelos descritivos que auxiliem na interpretação dos resultados das variáveis físico-químicas e permitam a associação destas com as propriedades funcionais analisadas. Além disto, PCA e clusters também foram empregados para análises do perfil espectral de ATR-FTIR, buscando uma rápida extração das informações relevantes deste conjunto complexo de dados. Tomados em conjunto, os resultados alcançados serão relevantes quanto a aspectos nutracêuticos e do potencial industrial daquelas biomassas, podendo agregar-lhes valor e a seus produtos derivados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DOS GENÓTIPOS

Amostras de raízes de dez genótipos de *M. esculenta* produzidas na safra 2010/2011 junto ao banco de germoplasma do programa de melhoramento genético de mandioca da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária do Estado de Santa Catarina (Epagri), em Urussanga (Latitude 28°31'18''; Longitude 49°19'03''), SC, Brasil foram utilizadas. Os dez genótipos alvos deste estudo denominam-se tradicionalmente: Apronta mesa, Pioneira, Oriental, Amarela, Catarina, IAC 576-70, Salézio, Estação, Crioulo de Videira e Rosada e foram selecionados em função de seu amplo cultivo por pequenos agricultores familiares. Tais genótipos apresentam importância econômica, social e ambiental e encontram-se inseridos em um ensaio de pesquisa participativa conduzido pela Epagri em diversas regiões do Estado de Santa Catarina.

2.2 ISOLAMENTO E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO AMIDO

As raízes, devidamente lavadas para remoção do excesso de solo e descascadas (retirada do felema, sendo mantida a entrecasca), foram moídas com o auxílio de um ralador manual. À massa obtida foram acrescentados 2 litros de água destilada/deionizada e realizada a suspensão das amostras por agitação. Em seguida, as suspensões foram filtradas utilizando-se duas peneiras (60 mesh) sobrepostas e elemento filtrante (*voil*) em dupla camada. A biomassa retida foi coletada e lavada com água destilada, em número de vezes suficiente à obtenção de filtrado incolor, i.e. sem amido. O filtrado foi transferido a copo béquero de 5 litros e devantado durante 5 horas. Subsequentemente, o sobrenadante foi removido e o amido depositado ressuspensão em 2 litros de água destilada/deionizada, repetindo-se o procedimento duas vezes para completa remoção do material solúvel e aumento do grau de pureza da fração amídica. O amido foi seco em estufa com circulação de ar a 45 °C, seguido do cálculo do rendimento de extração com base em peso seco. As amostras de amidos correspondentes a cada genótipo, após secagem, foram padronizadas à granulometria de 60 *mesh*, acondicionadas em frascos herméticos e armazenadas em local fresco, seco e ao abrigo da luz, para posterior análise.

2.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS

2.3.1 Concentração de amilose (método iodométrico)

O conteúdo de amilose das amostras de amido foi determinado segundo o procedimento colorimétrico descrito por Williams, Kuzina e Hlynka (1970). Amostras de 40 mg de amido/genótipo foram dispersas em 10 ml de solução de hidróxido de potássio $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, incubadas sob agitação *overnight* para completa gelatinização e posteriormente diluídas (10x) em água destilada. Aliquotas (10 ml) desta solução foram neutralizadas com 5 ml de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, com posterior adição de 0,5 ml de solução de lugol (20 g de KI e 2,0 g de iodo ressublimado, diluídos em 100 ml de água destilada) e seus volumes completados para 50 ml. A leitura da absorbância das soluções utilizou espectrofotômetro UV-visível (Gold spectrum lab 53 UV-*Vis* spectrophotometer, BEL photonics, Brazil) a 625 nm e os teores de amilose e amilopectina foram determinados empregando curva-padrão externa com uma solução de amilose e amilopectina nas proporções (0: 18; 2: 16; 4: 14; 6: 12; 8: 10,10: 10 e 12: 10) ($y = 38,9232x$, $r^2 = 0,99$), extraídas a partir de amido de mandioca, segundo McCready & Hassid (1943).

2.3.2 Densidade absoluta

O ensaio granulométrico para determinação da densidade foi realizado conforme o método de Chang (1988), com auxílio de picnômetro de gás hélio (Quantachrome®, modelo Multipicnômetro MVP – 4DC).

2.3.3 Capacidade de adsorção lipídica e de água

A capacidade de adsorção lipídica e de água foi determinada a partir da metodologia descrita por Beuchat (1977), com adaptações. A 1 g de amido foram adicionados 10 ml de água destilada ou óleo de soja comercial. A suspensão foi mantida em banho-maria (37°C , 30 min) sob agitação constante, seguida de centrifugação (4000 rpm/30 min.). O sobrenadante foi descartado e os valores de adsorção de água ou óleo retido por grama de amostra foram calculados.

2.3.4 Poder de Inchamento do amido – PI (%)

O poder de inchamento do amido (PI) dos genótipos em estudo foi determinado pelo método descrito por Leach, McCowen, & Schoch (1959), com modificações (MARCON, AVANCINI, & AMANTE, 2007; ARYEE *et al.*, 2006). Amostras (500 mg) foram transferidas para tubos *falcon* de 50 ml (com peso conhecido), adicionadas de água destilada até o volume de 40 ml, agitadas (*Vortex*) e incubadas em banho-maria (60°C, 60 min, agitação constante). Na sequência, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e centrifugados (2500 rpm, 20 min). O sobrenadante foi descartado e a massa do resíduo (gel) juntamente com o tubo *falcon* foi determinada. O poder de inchamento dos amidos foi estimado através da seguinte equação:

$$PI(\%) = \frac{P_G}{P_A} \times 100$$

Onde:

PI (%) = Poder de Inchamento do amido

P_G (mg) = Peso do gel

P_A (mg) = Peso da amostra de amido com a umidade corrigida

2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de amido previamente desidratadas em estufa a (45 °C, 24 h) foram comparadas quanto ao tamanho e forma dos grânulos por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, amostras (~ 10 mg) foram depositadas em fitas de carbono dupla face fixadas sobre porta amostras (*stubs*) de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro (espessura de 350 Å, Polaron E5001 coating system). As micrografias foram registradas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6390LV (JEOL Ltda. Tóquio, Japão), operando na faixa de energia de 10 Kv e magnificação de 500x a 2000x (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, Universidade Federal de Santa Catarina).

2.4.1 Diâmetro dos grânulos de amido

O tamanho dos grânulos foi mensurado a partir das micrografias de varredura, com magnificação de 500x e 2000x (5 imagens por amostra/10 medidas por imagem), com auxílio do software ImageJ®.

2.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Em difratômetro de raio X (X-ray Powder X'Pert PRO Multi-Purpose PanAnalytical, Holanda - Laboratório de Difração de Raios X (LDRX) - Universidade Federal de Santa Catarina, amostras de amido foram escaneadas com radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418\text{\AA}$), atuando na faixa angular 2θ de 4-50°. A variação 2θ foi empregada com um passo de 0,334° e intervalo de tempo de 10 segundos, operando em condições de 45 kV e 40 mA.

2.5.1 Índice de Cristalinidade (IC) da fração amídica

O índice de cristalinidade relativa (IC) foi determinado como proposto por Hayakawa *et al.*, (1997), com modificações, sendo a linha de base dos picos do difratograma definida a partir do perfil de uma amostra de amido amorfizado. A amostra de amido amorfizado foi obtida via moagem mecânica, utilizando moinho de esferas de alta energia (SPEX 8000 - Laboratório de Síntese e Caracterização dos Materiais LSCM – Universidade Federal de Santa Catarina). O tempo de moagem necessário para completa amorfização da amostra foi de 90 minutos. O IC foi definido como a razão entre a área cristalina (A_c) e a área total coberta pela curva, composto pela área da região cristalina (A_c) e a área da região amorfa (A_a), conforme a equação: $IC(\%) = A_c / (A_c + A_a) \times 100$

O software *Origin* (versão 7.0, Microcal, Inc., Northampton, MA, USA) foi utilizado para o cálculo da integral das áreas amorfa (A_a) e cristalina (A_c). A estimativa da cristalinidade dos amidos também foi calculada através dos espectros de FTIR, conforme previamente descrito por Rubens *et al.*, (1999) e Sevenou *et al.*, (2002).

2.6 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Espectros de FTIR dos amidos dos genótipos em estudo foram coletados em equipamento Bruker IFS-55 (Modelo Opus v. 5.0, Bruker Biospin, Germany), equipado com detector DGTS e sistema de reflexão única (ângulo de 45° de incidência), com acessório de atenuação da refletância total ATR (golden gate). Coletaram-se espectros de 5 replicatas/amostra, em janela espectral de 4000 a 400 ondas.cm⁻¹, com resolução de 4 ondas.cm⁻¹.

O processamento dos espectros utilizou o programa Essential FTIR (v.1.50.282) e considerou a delimitação da janela espectral de interesse (3000-600 ondas.cm⁻¹), a correção da linha de base, a normalização e a otimização da relação sinal/ruído (*smoothing*). Subsequentemente, o conjunto de dados dos espectros processados foi submetido à análise estatística multivariada, através da aplicação dos métodos de componentes principais (PCAs) em *scripts* implementados em R.

2.7 RAPID VISCO ANALYSER (RVA)

As variações da consistência do amido durante a formação da pasta, sob efeito da temperatura e da agitação, foram determinadas em viscosímetro *Rapid Visco Analyser* (RVA - Newport Scientific, Narabee, NSW, Austrália). Para tal, foram construídos amilogramas na concentração de amido de 14 % p/v (base peso seco) com água destilada-deionizada. As suspensões foram aquecidas de 50 a 95°C, na proporção de 3°C/min, permanecendo a 95°C por 5 minutos, seguido de resfriamento a 50°C na mesma razão. A velocidade de rotação foi fixada em 160 rpm. A partir dos perfis gráficos calculou-se a temperatura de empastamento, viscosidade máxima, temperatura no pico de viscosidade máxima, tempo para atingir o pico de viscosidade máxima, viscosidade mínima, viscosidade final no ciclo de resfriamento e a tendência à retrogradação (*setback*). A tendência à retrogradação foi obtida pela diferença entre a viscosidade final e a viscosidade mínima.

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste Tukey ($P < 0,05$) para comparação entre as médias utilizando os pacotes GraphPad Prism 5 e GraphPad InStat 3.06. Todos os procedimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata ($n=3$). Os dados espectrais de ATR-FTIR e as variáveis físico-químicas detectadas foram submetidos à análise estatística multivariada, via aplicação dos métodos de componentes principais (PCAs) e de agrupamentos (*clusters*) com a utilização da linguagem R (v.2.15.2), utilizando ferramentas dos pacotes Chemospac (HANSON, 2012) e Hyperspec (BELEITES, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS

3.1.1 Rendimento de extração

Os resultados das análises da composição físico-química dos amidos estão apresentados na Tabela 2. Os rendimentos na extração de amido variaram de 34,82% (genótipo Estação) a 57,28% (genótipo Apronta mesa). Este é um parâmetro importante a ser considerado, porque um maior rendimento em amido torna o processo economicamente mais atrativo industrialmente, porém o amido deve apresentar características físico-químicas e reológicas específicas e adequadas às exigências do mercado consumidor.

3.1.2 Concentração de amilose

Os dados gerados apontam para a existência de constituições amídicas significativamente distintas, principalmente em relação à proporção dos polissacarídeos presentes nas raízes dos genótipos em estudo, i.e., amilose e amilopectina. Uma grande amplitude nos conteúdos de amilose entre os genótipos estudados foi detectada, com teores variando de 15,30% (genótipo IAC 576-70) a 27,22 % (genótipo Videira) (Tabela 2). A proporção amilose/amilopectina é reconhecida como uma característica importante, porque afeta a funcionalidade do amido, assim como a organização física na estrutura granular (AMANTE, 1986; UARROTA *et al.*, 2013). Estas variações resultam em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais diferenciadas, definindo sua utilização em alimentos ou aplicações industriais (WANG & WHITE, 1994). Uma grande variação de conteúdos de amilose tem sido observada em genótipos de mandioca, e.g., 0%, em genótipos *waxys*, e 30%, em genótipos com alta concentração de amilopectina (ROLLAND-SABATÉ *et al.*, 2012); 15,2 a 26,5% (SÁNCHEZ *et al.*, 2009); 15,9 a 22,4% (CHARLES *et al.*, 2005) e ainda valores menores, i.e., 6 a 18,4% (GOMAND *et al.*, 2010), através do uso da técnica de precipitação da amilopectina via complexação com concanavalina A. De outra forma, conteúdos de 25,95 a 32,09 % de amilose foram relatados por Nunes, Santos & Cruz (2009), utilizando a mesma metodologia empregada neste trabalho.

Amidos com elevados teores de amilose são conhecidos por suas propriedades na formação de filmes e por apresentarem menor digestibilidade, comparativamente àqueles com maiores concentrações de amilopectina. De fato, um alto teor de amilose é desejado quando o produto necessita ser crocante e resistente, enquanto a amilopectina permite melhor manutenção da forma da pasta, conferindo maior resistência a tratamentos suplementares tais como o corte e a secagem. A amilopectina, ramificada, forma uma rede na matriz da pasta, contribuindo à expansão da massa e ao aumento de sua friabilidade (CEREDA *et al.*, 2001).

3.1.3 Densidade absoluta

A densidade é um fator importante na extração do amido, visto que a decantação e a centrifugação são operações unitárias realizadas neste processo. Quanto maior a densidade do amido, menor será o tempo de retenção nos decantadores e/ou nas centrífugas (NUNES, SANTOS & CRUZ, 2009). Além disto, é um parâmetro importante ao cálculo do volume específico, útil para o dimensionamento de embalagens e equipamentos (AMANTE, 1986). No presente trabalho, a densidade média dos amidos foi de $1,53 \text{ g.cm}^{-3}$, com amplitude de 1,43 g.cm^{-3} (genótipo Apronta mesa) a 1,64 g.cm^{-3} (genótipo IAC 576-70) (Tabela 2). Amidos de mandioca da região semiárida do estado da Bahia apresentaram valores de densidade absoluta de 1,50 a 1,58 g.cm^{-3} (NUNES, SANTOS & CRUZ, 2009). A densidade absoluta é uma característica do grânulo que permite prever a suscetibilidade à hidrólise enzimática para a produção de maltodextrinas (PERONI, ROCHA & FRANCO, 2006). O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos leva à formação de zonas de deposição mais ou menos densas. A região onde se encontra a amilopectina é mais densa ou cristalina. Por ser mais compacta, esta região mostra-se menos hidratada e mais resistente ao processo de hidrólise enzimática (CEREDA *et al.*, 2001). As regiões amorfas dos grânulos de amido (formadas principalmente pela amilose) são menos densas e, portanto, mais suscetíveis ao ataque enzimático, absorvendo mais água em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização (SINGH *et al.*, 2003).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e funcionais de amidos dos genótipos de mandioca. Valores são expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas nas colunas representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

Genótipos	Conteúdo de amilose (%)	Eficiência de extração (%)	Densidade do grânulo (g/cm^3)	Tamanho do grânulo (μm)	Poder de Inchamento a 60°C (%)	Adsorção lipídica (ml/g)	Adsorção de água (ml/g)	Cristalinidade (DRX) (%)
Apronta mesa	25,14 \pm 0,12b	57,28 \pm 6,90a	1,43 \pm 0,02e	12,976 \pm 0,98ab	8,82 \pm 1,14bcde	1,29 \pm 0,17ab	3,36 \pm 0,24abcd	38,47 \pm 2,95a
Pioneira	18,00 \pm 0,03g	52,30 \pm 10,01a	1,47 \pm 0,002de	11,99 \pm 1,53ab	7,80 \pm 0,44de	1,46 \pm 0,18a	2,92 \pm 0,26cd	45,07 \pm 3,19a
Oriental	20,87 \pm 0,06f	50,90 \pm 1,43a	1,49 \pm 0,003de	13,61 \pm 1,44a	9,35 \pm 0,92abcde	1,37 \pm 0,05ab	3,62 \pm 0,00a	41,09 \pm 5,96a
Amarela	25,20 \pm 0,13b	47,32 \pm 1,71a	1,49 \pm 0,004d	11,40 \pm 3,11ab	7,69 \pm 0,12e	1,47 \pm 0,16a	3,53 \pm 0,15ab	42,90 \pm 1,83a
Catarina	24,30 \pm 0,020c	55,01 \pm 4,20a	1,56 \pm 0,01bc	12,20 \pm 0,92ab	8,50 \pm 0,59cde	1,20 \pm 0,02ab	3,00 \pm 0,19bcd	43,04 \pm 6,84a
IAC 576-70	15,30 \pm 0,06h	51,97 \pm 10,8a	1,64 \pm 0,08a	13,19 \pm 3,12a	9,43 \pm 0,54abcd	1,27 \pm 0,06ab	3,36 \pm 0,01abcd	49,19 \pm 3,43a
Salézio	22,75 \pm 0,19e	41,97 \pm 1,28a	1,54 \pm 0,004bcd	10,82 \pm 1,02ab	9,06 \pm 0,08abcde	1,27 \pm 0,04ab	3,49 \pm 0,10abc	37,32 \pm 6,60a
Estação	20,79 \pm 0,14f	34,82 \pm 19,9a	1,50 \pm 0,002cd	10,26 \pm 2,52ab	10,21 \pm 0,18ab	1,32 \pm 0,06ab	2,85 \pm 0,45d	45,70 \pm 3,98a
Videira	27,22 \pm 0,15a	44,31 \pm 11,1a	1,48 \pm 0,01de	10,05 \pm 2,71ab	10,65 \pm 0,52a	1,26 \pm 0,03ab	2,95 \pm 0,08bcd	41,07 \pm 6,43a
Rosada	23,47 \pm 0,14d	52,39 \pm 13,9a	1,59 \pm 0,02ab	8,64 \pm 1,99b	9,53 \pm 0,13abc	1,12 \pm 0,12b	3,86 \pm 0,01a	42,17 \pm 3,02a

3.1.4 Capacidade de adsorção lipídica e de água

Os valores de adsorção lipídica e de água variaram de 1,12 a 1,47 ml.g⁻¹ e 2,85 a 3,86 ml.g⁻¹, respectivamente (Tabela 2). O genótipo Rosada apresentou maior capacidade de adsorção de água e menor capacidade de adsorção lipídica. As capacidades de adsorção de óleo e água dependem de fatores intrínsecos como a composição de aminoácidos, proteínas, polaridade da superfície dos grânulos e características de hidrofobicidade dos mesmos (KAUSHAL, KUMAR & SHARMA, 2012).

A adsorção de água em amidos usados para a produção de biscoitos deve ser baixa (MORRISON & TESTER, 1994; MORGAN & WILLIAMS, 1995), enquanto a formulação de alimentos como salsicha, massa de pão e produtos processados de queijo requer amidos com alta capacidade de adsorção de água (KAUSHAL, KUMAR & SHARMA, 2012). De outra forma, a habilidade do amido em adsorver óleo pode ser um indicativo do seu potencial emulsificante (ADEBOWALE *et al.*, 2005), sendo uma característica importante, uma vez que as gorduras atuam como retentores de sabor, tornando estes amidos mais adequados para realçar o *flavor* na formulação de alimentos (KAUSHAL, KUMAR & SHARMA, 2012). Além disso, Cereda *et al.*, (2001) descrevem que amidos com alto teor de amilose têm sido usados para reduzir a absorção de óleo em produtos fritos, devido a suas propriedades de formação de filmes.

3.1.5 Poder de Inchamento

O poder de inchamento é uma medida da capacidade de hidratação dos grânulos, porque a sua determinação consiste no peso do grânulo intumescido (inchado) e da água oclusa (MARCON, AVANCINI & AMANTE, 2007). Tipicamente, esta variável é dependente da capacidade de absorção d'água das moléculas de amido, via ligações de hidrogênio (ADEBOOYE & SINGH, 2008). Diferenças no poder de inchamento dos amidos indicam discrepâncias na organização intra-molecular dos grânulos dos genótipos estudados. No presente estudo, valores de PI de 7,69% (genótipo Amarela) a 10,65% (genótipo Videira), a 60° C, foram detectados (Tabela 2). Amidos de mandioca exibem fraca organização intra-molecular comparativamente a amidos de cereais, indicada pela baixa temperatura de relaxamento das

ligações de hidrogênio e rápido aumento dos grânulos (inchamento) a baixas temperaturas (60°C).

A amilose e o conteúdo lipídico possuem um significativo efeito no PI do grânulo, quando este é aquecido em excesso de água (MORRISON, SCOTT & KARKALAS, 1986). Amidos com alto teor de amilose caracterizam-se por valores menores de PI, isto porque a amilopectina é a fração responsável pelo inchamento.

3.1.6 Forma e diâmetro dos grânulos

O tamanho e a forma dos grânulos de amido variam com a espécie, e a distribuição de tamanho varia com o estágio de desenvolvimento da planta e forma de tuberização, podendo ainda se diferenciar entre genótipos da mesma espécie, conforme os resultados encontrados neste trabalho. Estas variáveis são de importância na determinação do potencial de uso dos amidos, e.g., grânulos pequenos ($\leq 2,0 \mu\text{m}$) podem ser usados como substitutos de gordura devido ao tamanho ser semelhante ao das gotículas de lipídeos (ZAMBRANO, CAMARGO & TAVARES, 2001). Outras aplicações referem-se à produção de filmes plásticos biodegradáveis e de papéis (LEONEL, 2007). Micrografias dos detalhes morfológicos dos grânulos de amido (Figura 12) revelam formas homogêneas e características típicas do amido de mandioca, i.e., arredondados, ovalados, convexos bicôncavos e de tamanhos variados. Foi possível observar também certa proporção de grânulos de amido danificados, provavelmente resultante da metodologia de extração, e a presença de uma fina estrutura parenquimatosa envolvendo os grânulos, (Figura 12 A e C), rica em materiais celulósicos e pécticos. Os tamanhos dos grânulos variaram de 8,64 μm (Rosada) a 13, 62 μm (Oriental) (Tabela 2) e são concordantes com os valores observados por Charoenkul *et al.*, (2011), com diâmetro dos grânulos variando entre 4,8 a 22,8 μm , Rickard, Asaoka & Blanshard, (1991) 5 a 20 μm , Siroth *et al.*, (1999) 8 e 22 μm e Niba *et al.*, (2002) 9 e 20 μm .

Um estudo das propriedades de empacotamento e coesão mostrou que o amido de mandioca, que tem forma arredondada e mais regular, exibiu menor fator de forma promovendo um melhor empacotamento de partículas, sendo útil na produção de cápsulas (ITIOLA & ODEKU, 2005). Quando usado como um agente de formulação de comprimidos de paracetamol, o amido de mandioca exibiu fortes propriedades de ligação (ITIOLA & AMOO, 1998). Chitedze *et al.*, (2012) mostraram

também que a escolha da variedade de mandioca é determinante à qualidade final de comprimidos de ibuprofeno, influenciando suas características mecânicas de ligação, desintegração, friabilidade e dureza.

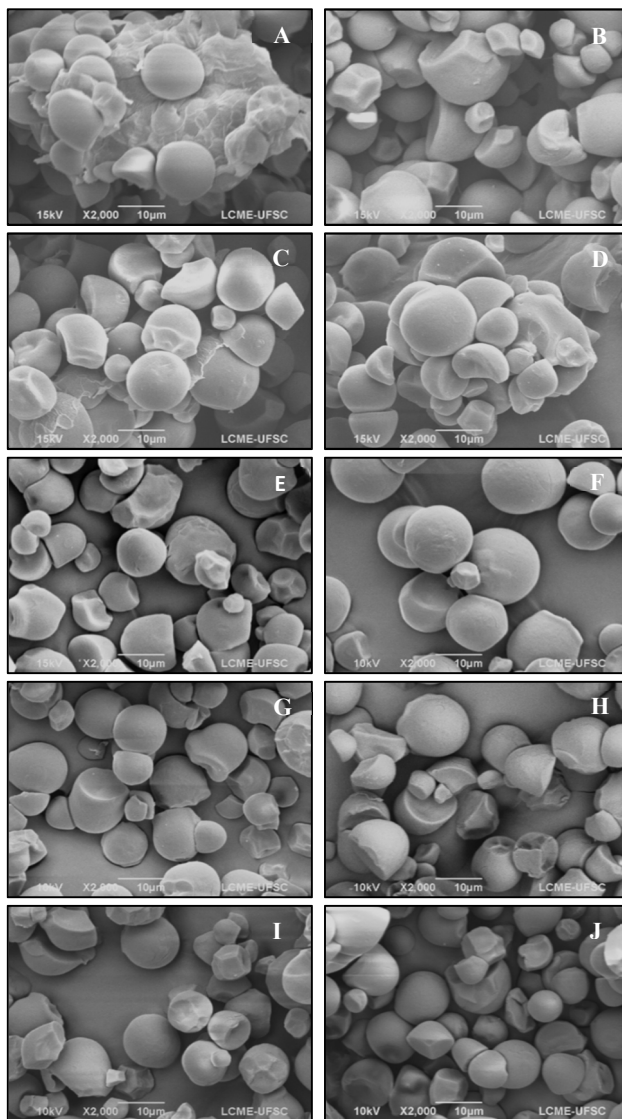


Figura 12 - Micrografias dos grânulos de amido de raízes de genótipos de mandioca. (Escala 10 µm). (A) Apronta mesa. (B) Pioneira. (C) Oriental. (D) Amarela. (E) Catarina. (F) IAC 5767-70. (G) Salézio. (H) Estação. (I) Videira e (J) Rosada.

3.1.7 Índice de Cristalinidade

Nas plantas, o amido é armazenado como corpos intracelulares parcialmente cristalinos denominados grânulos. Por meio da difração de raios X (DRX), podem-se distinguir três tipos de grânulos que, dependendo da sua forma e estrutura cristalina, denominam-se A, B, ou C (CEREDA *et al.*, 2001). Estes padrões de cristalinidade dependem, em parte, do comprimento das cadeias de amilopectina, da densidade de empacotamento dos grânulos e da presença de água (SAJILATA, SINGHAL & KULKARNI, 2006).

Segundo Zobel (1964) os grânulos de amido Tipo A, típicos de cereais, apresentam como características de cristalinidade picos de intensidade nos ângulos de difração 2Θ em $15,3^\circ$, $17,8^\circ$ e $23,5^\circ$; grânulos Tipo B picos de intensidade em $5,6^\circ$, $14,4^\circ$, $17,2^\circ$, $22,2^\circ$ e 24° e Tipo C em $5,6^\circ$, $15,3^\circ$, $17,3^\circ$ e $23,5^\circ$. O polimorfo tipo C é considerado um intermediário entre A e B, sendo característico de amido de leguminosas e sementes (ELIASSON & GUDMUNDSSON, 2006). Geralmente, amidos de tuberosas e raízes exibem padrão de difração tipo B, porém tem sido reportado por Franco, Ciacco, & Tavares, (1988), Moorthy, (1985), Gallant *et al.*, (1982) e Rosenthal *et al.*, (1974) que o amido de mandioca apresenta padrão de difração tipo-A.

A Figura 13 ilustra um difratograma típico dos genótipos estudados. Todas as amostras de amido de mandioca analisadas exibiram o padrão de difração tipo A, caracterizado por duplo sinal de $2\Theta \approx 17^\circ$ e 18° , em adição a uma intensa reflexão $2\Theta = 15^\circ$ e algumas reflexões adicionais a $2\Theta \approx 9,9^\circ, 11,2^\circ, 22,9^\circ$ (LOPEZ-RUBIO *et al.*, 2008).

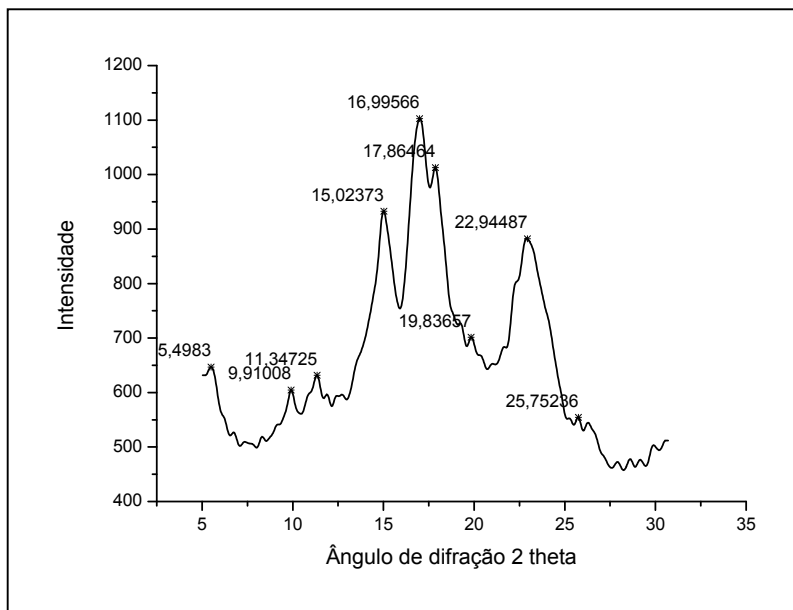


Figura 13 - Difratograma de raio-X típico dos genótipos de mandioca estudados. Os picos de intensidade nos ângulos de difração 2 theta no difratograma são característicos de polimorfismo tipo A.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores referentes ao índice de cristalinidade medidos via DRX para os genótipos estudados. Os valores dispersaram-se entre 37,3% (Salézio) a 49,1% (IAC 576-70), com cristalinidade média de 42,6%. Mutungi et al., (2012) detectaram uma amplitude de valores de cristalinidade para amidos de mandioca de 33,4 a 58,2%, a partir de um modelo amorfo como referência para linha de base no difratograma, conforme descrito neste trabalho.

A região cristalina do grânulo de amido é formada por cadeias laterais de amilopectina, enquanto a região amorfa é composta por amilose e ramificações de amilopectina. Assim, a cristalinidade do grânulo está, principalmente, relacionada às duplas hélices formadas pelas ramificações de amilopectina (HOOVER, 2001). Este fato é concordante com os resultados obtidos por este trabalho. O genótipo IAC 576-70 que apresentou os maiores teores de amilopectina, apresentou o maior índice de cristalinidade.

A amilopectina tem um papel principal na cristalinidade dos grânulos de amido. Altas temperaturas de gelatinização têm sido relatadas como resultantes do alto grau de cristalinidade, que fornece estabilidade estrutural aos grânulos e maior resistência à gelatinização. Assim, a presença de amilose reduz o ponto de fusão das regiões cristalinas e a energia para iniciar a gelatinização, pois as cadeias longas de amilopectina requerem uma maior temperatura para dissociar completamente, comparativamente àquela requerida para cadeias mais curtas das duplas hélices. Amidos com altos conteúdos de amilose têm maior proporção de região amorfa, exibindo perdas de cristalinidade em temperaturas menores de gelatinização (SINGH *et al.*, 2003).

Na indústria farmacêutica, por exemplo, o amido é largamente utilizado como excipiente. Certo grau de cristalinidade é requerido para o amido manter a especificidade de liberação da droga e outras propriedades funcionais (PIFFERI, SANTORO & PEDRANI, 1999). Na formulação de comprimidos, mudanças na cristalinidade podem ocorrer durante a produção devido à secagem, granulação, revestimento, compressão e refinamento, porque aquele polissacarídeo é exposto ao estresse mecânico, mudanças de temperatura e umidade. Amorfização ou cristalinização também podem ocorrer durante o armazenamento e induzir mudanças na solubilidade, dissolução e biodisponibilidade do ingrediente ativo (VEIJ *et al.*, 2009).

3.1.8 Propriedades de Pasta (RVA)

A viscosidade é uma das propriedades mais importantes dos materiais amiláceos. A curva de viscosidade representa o comportamento daquele polissacarídeo durante o aquecimento e permite avaliar as características da pasta formada, devido às modificações estruturais do amido e a tendência à retrogradação durante o resfriamento (COTINHO & CABELLO, 2005). Na indústria de alimentos, esta propriedade é a mais estudada, por ser o amido largamente empregado como espessante em inúmeras formulações (WHISTLER & PASCHAL, 1965).

A construção das curvas de viscosidade representa importante ferramenta às observações do comportamento do gel de amido e suas relações com as condições de processamento, i.e., aquecimento, agitação e resfriamento (MARCON, AVANCINI & AMANTE, 2007).

Durante a fase inicial de aquecimento, um aumento na viscosidade é registrado no RVA derivado do inchamento dos grânulos.

Neste ponto, polímeros com menor massa molecular, particularmente moléculas de amilose, começam a ser lixiviadas dos grânulos. Um pico de viscosidade é obtido durante o empastamento, quando os grânulos, em sua maioria, estão totalmente inchados, havendo também grânulos intactos e o alinhamento molecular dos polímeros solubilizados ainda não ocorreu dentro do campo de atrito do instrumento. Durante a fase de temperatura (95 °C) e agitação constantes, os grânulos começam a quebrar, a solubilização dos polímeros continua e o alinhamento molecular ocorre dentro do campo de atrito do instrumento, causando uma diminuição da viscosidade (THOMAS & ATWELL, 1999). No resfriamento, alguns polímeros de amilose e amilopectina solubilizados começam a se reassociar, formando um precipitado ou gel, causando um aumento na opacidade da pasta. Este processo é chamado retrogradação ou *setback* (WHISTLER & BEMILLER, 1997).

As propriedades reológicas das pastas de amido estão relacionadas com o teor de amilose, mas também são influenciadas pelas interações entre os componentes ou pelo elevado nível de organização (cristalinidade) e pelas propriedades do grânulo (tamanho, estrutura, distribuição, capacidade de adsorção de água, entre outros) (JUHÁSZ & SALGÓ, 2008).

Os perfis viscoamilográficos dos amidos dos genótipos em estudo apresentaram curvas típicas para amidos de tuberosas e foram semelhantes quanto ao formato (Figura suplementar 1). Os dados reológicos das pastas dos amidos estudados estão apresentados na Tabela 3.

As curvas mostraram que a temperatura inicial de pasta dos genótipos ficou na faixa de 63,25 a 65,35 °C, a viscosidade máxima entre 245,9 a 271,7 mPa s, temperatura de viscosidade máxima de 98,31 a 99,74°C, viscosidade mínima de 121,83 a 142,00 mPa s, viscosidade ao final do resfriamento de 184,25 a 222,42 mPa s e tendência a retrogradação de 52,25 a 80,42 mPa s entre os genótipos de menores e maiores valores.

Sánchez *et al.*, (2010) observaram valores de viscosidade máxima de 876 a 1006 mPa s em amidos de mandioca e temperatura de formação de pasta de 63,3 a 64,8°C. Em cereais foram encontradas temperaturas de empastamento maiores: 84°C para milho e 89°C para arroz. Pico de viscosidade em batata 2550 mPa s, milho 176 mPa s e arroz 343 mPa s.

A viscosidade do gel formado durante e após o aquecimento é um importante fator em um processo de seleção. Propriedades de pasta são dependentes da rigidez dos grânulos de amido que, por sua vez, afetam o poder de inchamento e do conteúdo de amilose lixiviada à solução. A maior temperatura de empastamento indica a presença de amido altamente resistente ao inchamento e a ruptura. Quando um número suficiente de grânulos torna-se inchado, um rápido aumento da viscosidade ocorre, conhecido como pico de viscosidade. O aumento da viscosidade com o aumento da temperatura deve-se à remoção de água a partir da extrusão da amilose, à medida que os grânulos incham. A viscosidade final indica a habilidade do material em formar uma pasta viscosa determinada pela retrogradação da amilose solúvel após o arrefecimento. Tendências inferiores à retrogradação são vantajosas em produtos alimentares, tais como sopas e molhos, que são submetidos à perda de viscosidade e precipitação. A principal influência da retrogradação é observada na textura, na aceitabilidade e na digestibilidade dos alimentos que contém amido (ELIASSON, 1996; THARANATHAN, 2002; ELIASSON, 2004). Com isso, pode-se destacar a influência do processo de retrogradação no envelhecimento de pães e produtos de panificação, bem como na perda de água (sinereze) de algumas sobremesas que utilizam o amido como espessante (DENARDIN & SILVA, 2009). Para a elaboração de tais produtos, é desejado um amido com menor tendência à retrogradação, como é o caso do amido de mandioca. O baixo *setback* observado nestes genótipos sugere alta resistência à retrogradação e, portanto formação de uma pasta mais estável (KAUSHAL *et al.*, 2012).

Tabela 3 - Propriedades viscoamilográficas das amostras dos genótipos de mandioca estudados. Temperatura inicial de pasta (°C), viscosidade máxima (mPa s), tempo para atingir a viscosidade máxima (min), temperatura no pico de viscosidade máxima(°C), viscosidade mínima (mPa s), viscosidade final no ciclo de resfriamento (mPa s), *breakdown* (mPa s) (viscosidade máxima – viscosidade mínima) e *setback* (mPa s) (Viscosidade final – viscosidade mínima).

Genótipos	Temp, inicial de pasta (°C)	Viscosidade máxima (mPa s)	Tempo (min)	Temperature no pico de viscosidade (°C)	Viscosidade mínima (mPa s)	Viscosidade final (mPa s)	Breakdown (mPa s)	Setback (mPa s)
Apronta mesa	65,25	271,67	5,93	99,48	142,00	222,42	129,67	80,42
Pioneira	64,15	249,67	5,27	99,74	121,83	189,58	127,83	67,75
Oriental	63,25	264,17	5,20	99,61	131,50	184,25	132,67	52,75
Amarela	65,30	264,92	5,13	99,48	124,75	192,50	140,17	67,75
Catarina	64,25	252,42	5,87	98,70	132,33	207,00	120,08	74,67
IAC 576-70	63,55	245,92	5,73	98,96	134,00	186,25	111,92	52,25
Salézio	65,15	258,33	5,67	99,74	128,42	200,67	129,92	72,25
Estação	65,35	249,92	6,07	99,87	141,08	212,50	108,83	71,42
videira	63,40	250,08	6,47	98,31	137,92	214,25	112,17	76,33
Rosada	65,15	253,08	5,93	98,70	132,33	198,25	120,75	65,92

3.1.9 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio (FTIR)

A análise do perfil espectral de ATR-FTIR (Figura 14) de amostras de amido oriundo das raízes do genótipos estudados revela a presença da maioria dos constituintes químicos na região do *fingerprint* entre 700 a 1700 cm^{-1} , onde sinais comumente associados à ocorrência de proteínas, lipídeos, amilose e amilopectina foram claramente identificados. De maneira geral, os carboidratos mostraram um aumento nos valores de absorvância na faixa espectral de infravermelho entre 1200 – 950. cm^{-1} , considerada uma região de *fingerprint* desta classe de metabólitos primários (CERNÁ *et al.*, 2003) e representam os picos de maior intensidade detectados neste estudo. Já os constituintes proteicos são identificados através dos sinais em 1650 e 1550 ondas.cm^{-1} , relativos às aminas primárias (LAMBERT *et al.*, 2001). A presença de grupos carboxílicos, associada à deformação axial do grupo funcional C=O, tipicamente encontrados em ácidos graxos, por exemplo, pode ser detectada pelo sinal em 1740 cm^{-1} e sinais entre 3000-2800 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 1994).

Estudos anteriores têm mostrado que algumas bandas de absorção de infravermelho são altamente sensíveis à conformação dos polímeros amilose e amilopectina (WILSON & BELTON, 1988; VAN SOEST *et al.*, 1995; SEVENOU *et al.*, 2002; BERNAZZANI *et al.*, 2008). De acordo com diversos autores (VAN SOEST *et al.*, 1995; SEVENOU *et al.*, 2002; KUHNEN *et al.*, 2010), as bandas em 1018 e 999 cm^{-1} são diagnósticos à caracterização de amilose e amilopectina e representam o ordenamento amorfo e cristalino dos grânulos, respectivamente. Estas duas bandas foram detectadas em todas as amostras de amido de mandioca analisadas, apresentando diferentes intensidades. Por este propósito, uma análise complementar da estimativa da cristalinidade dos grânulos de amido foi realizada, através do cálculo da razão entre os valores de intensidades das absorvâncias daquelas bandas com absorção em 999 cm^{-1} e 1018 cm^{-1} , como previamente sugerido por Kuhnén *et al.*, (2010). Estes valores estão apresentados na Tabela 4.

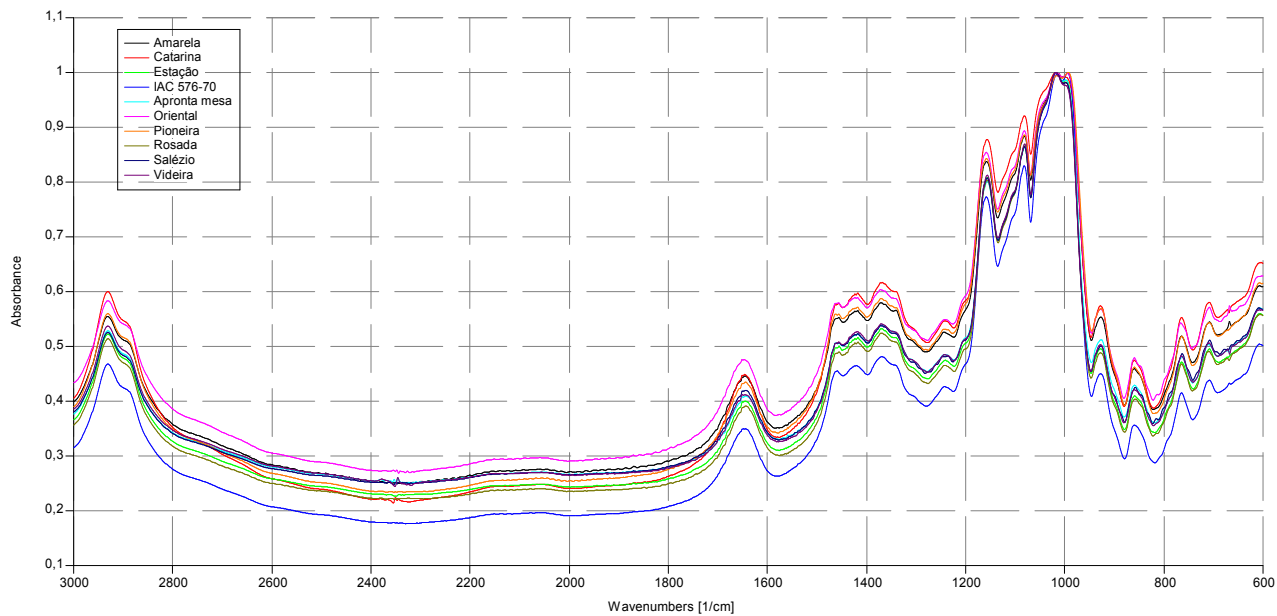


Figura 14 – Perfil espectral (ATR-FTIR, 3000 – 600 cm^{-1}) de amostras de amido dos dez genótipos de mandioca estudados.

Tabela 4 - Relação entre as absorbâncias de infravermelho em 999 e 1018 cm^{-1} para os amidos oriundos dos genótipos estudados.

Amostras	razão IR 999/1018 (cm^{-1})
Apronta mesa	0.986
Videira	0.977
Rosada	0.981
Salézio	0.981
Estação	0.986
Catarina	0.991
Oriental	0.998
Amarela	0.998
IAC 576-70	1.003
Pioneira	1.005

Como a intensidade das bandas em 999 cm^{-1} refere-se à fração amilopectina e 1018 cm^{-1} à amilose, quanto maior a razão IR 999/1018 cm^{-1} maior o conteúdo de amilopectina nas amostras analisadas e por consequência, maior a cristalinidade destes grânulos. Os valores observados apresentaram correlação linear negativa significativa com os teores de amilose das amostras analisadas através do ensaio iodométrico (correlação linear de Pearson $r = -0,702$, $p < 0,05$) (Figura 15).

A Figura 16 ilustra as intensidades nas bandas correspondentes à amilose e amilopectina entre os genótipos Apronta mesa e Pioneira. Os genótipos IAC 576-70 e Pioneira, por exemplo, apresentaram menores teores de amilose através do ensaio iodométrico, bandas menos intensas em 1018 cm^{-1} e com maiores intensidades em 999 cm^{-1} nos espectros de ATR-FTIR, resultando em um valor > 1.0 à razão IR 999/1018. cm^{-1} , indicativo de maior cristalinidade.

Essa observação permitiu verificar que os dados gerados a partir das análises de ATR-FTIR e DRX foram concordantes e robustos ao cálculo do índice de cristalinidade dos amidos de mandioca neste estudo. Adicionalmente, observou-se que os índices de cristalinidade calculados por IR e DRX apresentaram correlação linear negativa com os conteúdos de amilose calculados através do método iodométrico ($r =$

- 0,702 e $r = - 709$, respectivamente, $p < 0,05$) e correlação linear positiva entre as duas abordagens de cálculo de IC ($r = 0,593$, $p < 0,05$), conforme Figura 15.

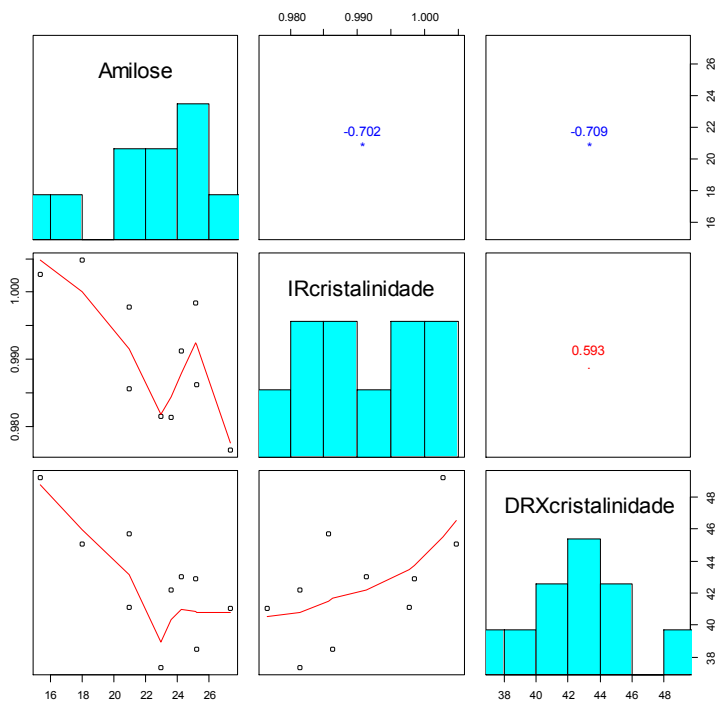


Figura 15– Correlação linear de Pearson para os valores de cristalinidade calculados por IR e DRX e conteúdo de amilose.

A análise dos perfis espectrais revelou similaridade de composição química entre os amidos de mandioca estudados. Porém, não raro, a análise visual dos espectros de ATR-FTIR não permite a extração de quantidades maximizadas de informações. A técnica de FTIR torna-se ainda mais promissora quando associada a técnicas de análise estatística multivariada, particularmente através da determinação dos componentes principais (PCAs) e agrupamentos (clustering), uma vez que a mesma permite a rápida extração de informações relevantes de um conjunto de dados complexos e possibilita o entendimento mais detalhado das eventuais discrepâncias e/ou similaridades existente no

conjunto de dados espectrais. Essa abordagem tem sido comumente utilizada para verificar a autenticidade de alimentos, permitindo a identificação dos sinais espectrais mais significativos e que corroboram para explicar de forma mais ampla a variabilidade amostral de um conjunto de dados (FUKUSAKI & KOBAYASHI, 2005).

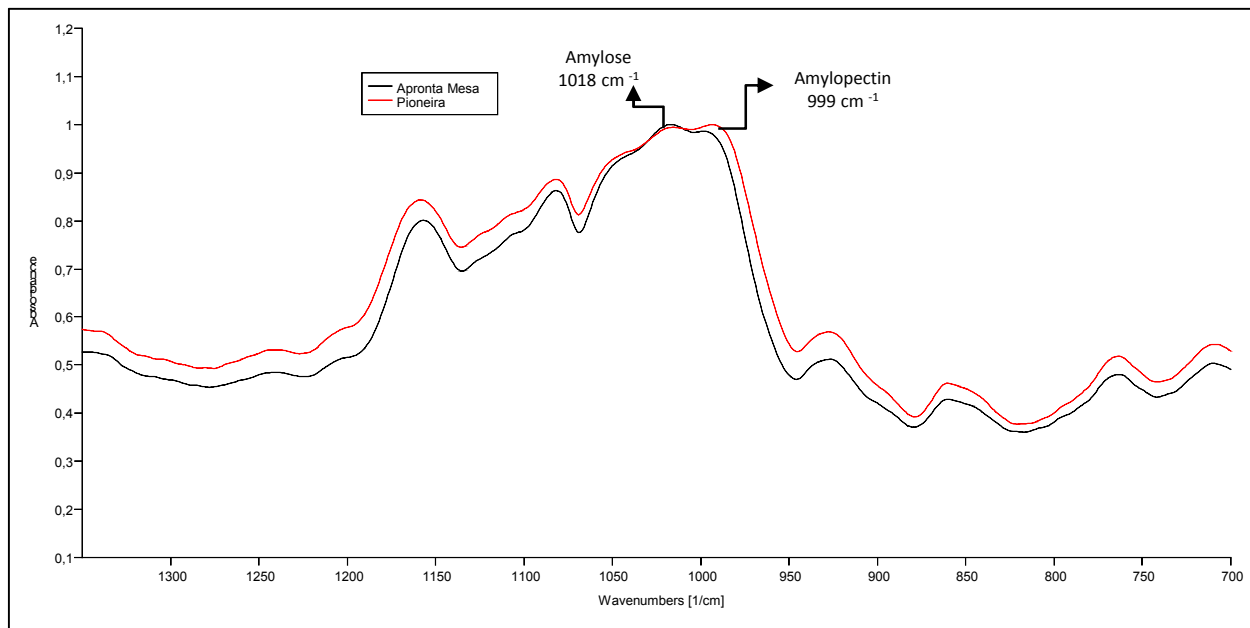


Figura 16 – Espectro parcial de FTIR ($1400\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$) dos amidos dos genótipos Apronta mesa e Pioneira demonstrando as intensidades dos picos em 1018 cm^{-1} e 999 cm^{-1} , característicos de amilose e amilopectina, respectivamente.

3.2 ANÁLISES DE COMPONENTES PRINCIPAIS E CLUSTERS

Na análise de componentes principais aplicada aos dados das variáveis físico-químicas e funcionais, os três primeiros componentes contaram com 30,02; 29,63 e 15% da variação, respectivamente, expressando 74,66% do total da variância (Figura 17). As variáveis PI, densidade do grânulo e índice de cristalinidade calculado por DRX estão positivamente correlacionadas em PC1+, enquanto os dados reológicos, *breakdown* e pico de viscosidade e adsorção lipídica representam as variáveis mais significativas em PC1-. O segundo componente está principalmente correlacionado ao conteúdo de amilose e *setback* (tendência à retrogradação) em PC2+ e aos índices de cristalinidade calculados por IR e DRX em PC2-. As variáveis com maiores contribuições fatoriais expressas no terceiro componente foram a adsorção lipídica e *setback* em PC3+ e a capacidade de adsorção de água, tamanho do grânulo e eficiência de extração em PC3- (valores de loadings para PC1, PC2 e PC3, ver Tabela suplementar 1).

O conteúdo de amilose (PC2+), obtido através do método iodométrico, apresentou forte correlação negativa com os índices de cristalinidade calculados por IR ($r = - 0,702$) e DRX ($r = - 0,709$), densidade ($r = - 0,398$) e tamanho do grânulo ($r = - 0,407$) e adsorção lipídica ($r = - 0,214$) (PC2-) e correlação positiva com adsorção de água ($r = 0,071$) e com os dados reológicos, e.g., tendência à retrogradação (*setback*) ($r = 0,708$) temperatura de empastamento ($r = 0,297$) viscosidade máxima ($r = 0,462$) e poder de inchamento ($r = 0,108$) (PC2+). A construção do modelo descritivo baseado no cálculo dos componentes principais permitiu algumas inferências quanto ao comportamento das propriedades funcionais dos amidos estudados, derivadas de suas características físico-químicas. Estes resultados condizem com as informações que correlacionam a estrutura cristalina dos grânulos às duplas hélices formadas pelas ramificações da amilopectina (HOOVER, 2001), que consideram as regiões amorfas dos grânulos de amido (formadas principalmente pela amilose) menos densas, portanto, mais suscetíveis ao ataque enzimático e com maior absorção de água em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização (CEREDA *et al.*, 200; SINGH *et al.*, 2003). Adicionalmente, descrevem o conteúdo de amilose tradicionalmente ligado com uma maior tendência à retrogradação, devido a sua forte

tendência de reassociação por meio de ligações de hidrogênio com outras moléculas de amilose adjacentes (SINGH *et al.*, 2003).

A análise de componentes principais, a partir das variáveis físico-químicas estudadas, permitiu aceitável separação entre os amidos dos genótipos de mandioca avaliados. As similaridades foram definidas com base na distância (distância euclidiana) entre duas amostras usando média aritmética (UPGMA). Genótipos de maior similaridade em suas características físico-químicas e funcionais estão representados através da análise hierárquica de *cluster* na Figura 18. A correlação cofenética (similaridade entre genótipos membros de um mesmo cluster) foi de 65,71%.

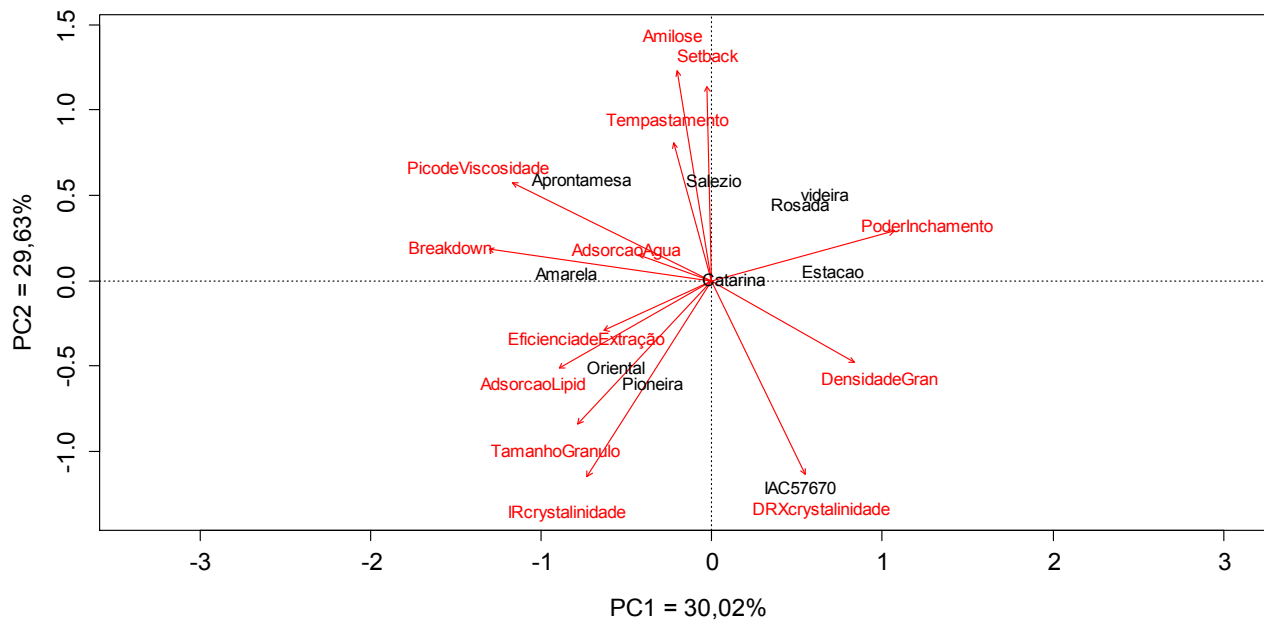


Figura 17- Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para as variáveis físico-químicas analisadas em raízes de genótipos de *M. esculenta*.

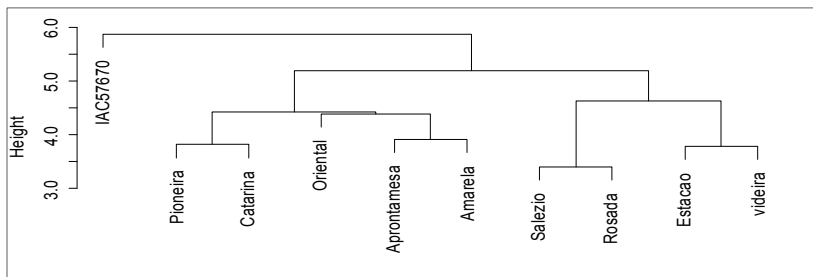


Figura 18 – Similaridades entre amidos de genótipos de mandioca com respeito às suas características físico-químicas e funcionais. Análise hierárquica com base na distância euclidiana (UPGMA). Correlação cofenética de 65,71%.

Quando a análise dos componentes principais foi aplicada à matriz de dados obtida a partir dos espectros FTIR (janela espectral situada entre 3000 e 600 ondas. cm^{-1}) (Figura 19), os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 98,46% a variância presente nos dados. As análises destes componentes, por sua vez, não revelam um claro agrupamento amostral, antes uma dispersão das amostras estudadas por todos os quadrantes do gráfico de distribuição fatorial. A análise das contribuições fatorais revelou que principalmente as bandas em 970, 1180 e 2925 cm^{-1} contribuíram à dispersão amostral ao longo de PC1, indicando que os amidos dos genótipos estudados possuem constituição química diferenciada. As classes dos compostos glicídicos (970 e 1180 ondas. cm^{-1}) e lipídicos (2925 ondas. cm^{-1}) apresentaram maior efeito na classificação dos genótipos no modelo descritivo construído via PCA.

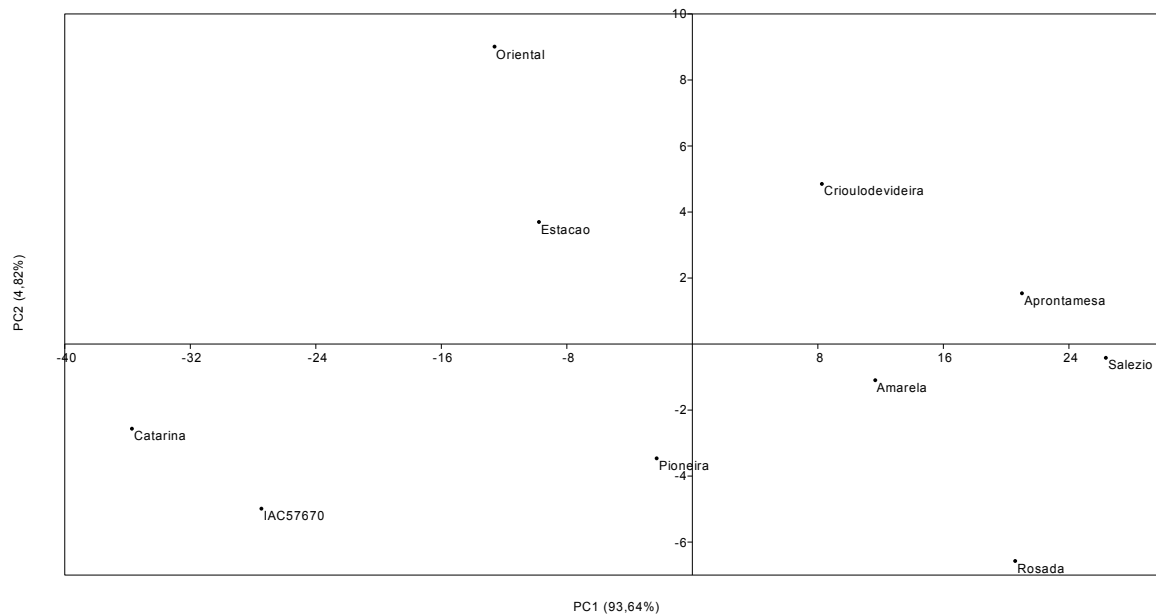


Figura 19 - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de ATR-FTIR (3000-600 cm^{-1}) dos amidos de mandioca estudados. PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 98,46% a variância presente nos dados. As análises destes componentes, por sua vez, não revelam um claro agrupamento amostral, e uma dispersão das amostras estudadas por todos os quadrantes do gráfico de distribuição fatorial.

Um segundo procedimento experimental ao cálculo dos componentes principais considerou os dados espectrais da janela entre 1200-950 ondas.cm^{-1} , i.e., região de *fingerprint* de carboidratos. A Figura 20 demonstra que os componentes principais PC1 e PC2 explicaram em 99,2% a variância existente, revelando claramente a existência de dois grupos de genótipos de acordo com suas similaridades, a saber, os genótipos: Rosada, Crioulo de Videira, Salézio e Apronta mesa em PC2 +, e os genótipos: Pioneira, Oriental e Amarela em PC2-. Os valores de contribuições fatoriais (*loadings*) correlatados com PC2 referem-se às bandas em 1015 e 970 cm^{-1} , indicadoras de amilose e amilopectina, respectivamente (valores de *loadings* de PC2 apresentados na Figura suplementar 2).

Além disto, os genótipos: IAC 576-70, Catarina e Estação destacaram-se dos demais, apresentando perfis metabólicos discrepantes em comparação aos demais genótipos analisados, sugerindo uma composição química peculiar entre os mesmos. O cálculo dos componentes principais para os dados espectrais das regiões de *fingerprints* típicas de lipídeos (3000-2800 ondas.cm^{-1}) (Figura suplementar 3) e proteínas (1650-1500 ondas.cm^{-1}) (Figura suplementar 4) também permitiram uma forte discriminação entre estas amostras, principalmente entre os genótipos IAC 576-70 e Catarina, comparativamente à dispersão constatada para as outras amostras analisadas.

Através da análise quimiométrica, baseada na distância entre os *scores* dos componentes principais, constatou-se que os genótipos IAC 576-70 e Catarina representam *outliers*, possuindo perfis espectrais bastante distintos das demais amostras (Figura suplementar 5). Esta é uma informação relevante quando se almeja explorar genótipos que apresentem amidos com características químicas peculiares, de significância à indústria alimentícia e farmacêutica, por exemplo.

Pode-se visualizar ainda que a classificação e agrupamento dos genótipos via análise dos componentes principais, usando a região de *fingerprint* para carboidratos, apresenta adequada relação com os agrupamentos formados pelas análises quimiométricas, realizadas a partir dos resultados obtidos com dados físico-químicos e funcionais. Os agrupamentos formados pela distribuição fatorial são condizentes com os resultados obtidos pelo cálculo da cristalinidade calculada por FTIR (Tabela 4). Os genótipos Apronta mesa, Videira, Rosada e Salézio, que apresentaram menor razão 999/1118 ondas.cm^{-1} (maiores teores de

amilose) apresentam-se agrupados em em PC1+/PC2+, sugerindo que a análise de IR representa uma ferramenta de análise rápida e eficaz à caracterização de amidos de mandioca.

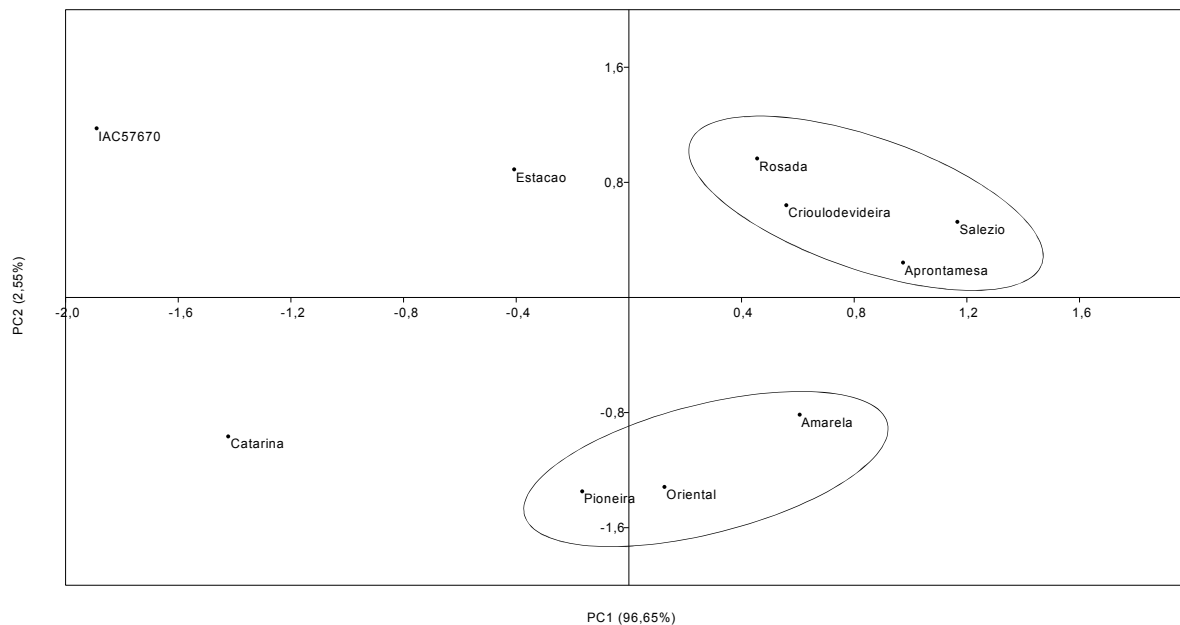


Figura 20 – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os espectrais de ATR-FTIR (1200-950 ondas. cm^{-1}) dos amidos de mandioca estudados. PC1 e PC2 explicaram em 99,2% a variância existente, revelando claramente a existência de dois grupos de genótipos de acordo com suas similaridades.

5 CONCLUSÕES

A abordagem metodológica utilizada neste trabalho permitiu identificar e caracterizar a variabilidade química dos genótipos analisados. Além disto, as técnicas analíticas empregadas e os ensaios reológicos realizados, associados às análises quimiométricas (PCAs e *clusters*), possibilitaram distinguir e/ou agrupar os genótipos avaliados de acordo com suas peculiaridades físico-químicas e funcionais. Desta maneira, aplicações industriais e alimentares podem ser tentadas de acordo com os genótipos fontes daquelas biomassas peculiares. Por exemplo, os genótipos com maiores teores de amilose (Crioulo de Videira, Amarela e Apronta mesa) possuem propriedades requeridas quando determinado produto necessita ser crocante, resistente e com baixa adsorção de óleo, i.e., a fabricação de *chips*. Além disso, amidos com altos teores de amilose são associados à menor resposta glicêmica, redução nos níveis de colesterol plasmático e esvaziamento mais lento do trato gastrointestinal em relação aqueles com baixos níveis de amilose (FREI *et al.*, 2003), representando um fator de diferenciação à indústria alimentar, com vista à inovação que busca novos materiais com propriedades funcionais nutraceuticas. Amidos de mandioca que apresentam grânulos com forma arredondadas e mais regulares promovem um melhor empacotamento das partículas, sendo útil, à indústria farmacêutica na formulação de cápsulas e comprimidos (CHITEDZE *et al.*, 2012). Além disto, certo grau de cristalinidade é requerido para o amido manter a especificidade de liberação da droga e outras propriedades funcionais (PIFFERI, SANTORO & PEDRANI, 1999). Tendência a menor retrogradação (genótipos: IAC 576-70, Oriental e Rosada) confere ao amido a propriedade de formação de uma pasta mais estável (KAUSHAL *et al.*, 2012), sendo vantajosa em produtos alimentares como sopas e molhos, que são submetidos à perda de viscosidade e precipitação.

A espectroscopia vibracional de infravermelho, combinada com técnicas quimiométricas revelou discrepâncias nos perfis químicos dos genótipos e representa uma ferramenta de análise rápida e eficaz para caracterização de amidos de mandioca. Os perfis espectrais dos genótipos IAC 576-70, Catarina e Estação destacaram-se dos demais, apresentando perfis metabólicos discrepantes em comparação com os outros genótipos analisados, sugerindo uma composição química peculiar entre os mesmos.

Assume-se, portanto, que o uso concomitante das tecnologias empregadas neste trabalho seja de grande interesse à investigação das características estruturais da fração amídica oriunda de bancos de germoplasma de *M. esculenta*. Tomados em conjunto, os resultados obtidos podem ser empregados como ferramentas de apoio aos programas de melhoramento genético de mandioca assitidos bioquimicamente, otimizando o processo de seleção e também de manutenção da diversidade genética existente em bancos de germoplasma e em poder dos produtores rurais. Adicionalmente, estes resultados enfatizam a importância da manutenção *on farm* destes genótipos pelos pequenos agricultores familiares do sul do Brasil e por bancos de germoplasma, com vistas à sua preservação, já que representam uma importante fonte de recursos fitogenéticos com características nutricionais e industriais promissoras.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOOYE, V.C., SINGH, V. Physico-chemical properties of the flours and starches of two cowpea varieties (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 92-100, 2008.

ADEBOWALE, K.O., OLU-OWOLABI, B.I., OLAYINKA, O.O., LAWAL, O.S. Effect of heat moisture treatment and annealing on physicochemical properties of red sorghum starch. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 928-933, 2005.

AMANTE, E.R. Caracterização de amidos de variedades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) e da batata doce (*Ipomoea batatas*). Dissertação. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Viçosa, Minas Gerais. Brasil, 1986.

ARYEE, F.N.A., ODURO, I., ELLIS, W.O., AFUAKWA, J.J. The physicochemical properties of flour samples from the roots of 31 varieties of cassava. **Food Control**, v. 17, p. 916-922, 2006.

BELEITES, C. Import and Export of Spectra Files. Vignette for the R package hyperSpec. 2011.

BEUCHAT, L. R. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 258-261, 1977.

BERNAZZANI, P., PEYYAVULA, V.K., AGARWAL, S., TATIKONDA, R.K. Evaluation of the phase composition of amylose by FTIR and isothermal immersion heats. **Polymers**, v. 49, p. 4150–4158, 2008.

BILIADERIS, C. G. Structures and phase transitions of starch in food systems. **Food Technology**, v. 145, p. 98-109, 1992.

CEREDA, M. P., FRANCO, C. M. L., DAIUTO, E. R., DEMIATE, I. M., CARVALHO, L. J. C. B., LEONEL, M. Propriedades gerais do amido. Serie: culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas, v. 1. São Paulo, Brasil: Fundação Cargill, 2001.

CERNÁ, M., BARROS, A.S., NUNES, A., ROCHA, S.M., DELGADILLO, I., COPÍKOVÁ, J., COIMBRA, M.A. Use of FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 383–389, 2003.

CHANG, C. S. Measuring density and porosity of grain kernels using a gas pycnometer. **Cereal Chemistry**, v. 65, p. 13-15, 1988.

CHAROENKUL, N., UTTAPAP, D., PATHIPANAWAT, W., TAKEDA, Y. Physicochemical characteristics of starches and flours from cassava varieties having different cooked root textures. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1774-1781, 2011.

CHARLES, A. L., CHANG, Y. H., KO, W. C., SRIROTH, K., & HUANG, T. C. Influence of amylopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of cassava starches. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2717–2725, 2005.

CHITEDZE, J., MONJEREZI, M., SAKA, J.D. K., STEENKAMP, J. Binding effect of cassava starches on the compression and mechanical properties of ibuprofen tablets. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 02, p. 31-37, 2012.

COUTINHO, A. P. C., CABELLO, C. Caracterização reológica da fécula de mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais – Botucatu, SP** – v. 1, p. 40 - 48, 2005.

DENARDIN, C. C., SILVA, L.P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39 ,p. 945- 954, 2009.

ELIASSON, A.C. **Carbohydrates in food**. New York : Marcel Dekker, 1996.

ELIASSON, A.C. **Starch in food – Structure, Function and Applications**. New York: Boca Raton, CRC, 2004.

ELIASSON, A. N., GUDMUNDSSON, M. Starch: Physicochemical and functional aspects. In ELIASSON, A. N. (ed.) **Carbohydrates in Food**, v. 2, p 391-469, 2006.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Rome, Italy. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/>. Acesso em: 13/04/2012.

FRANCO, C. M. L., CIACCO C. F., TAVARES, D. Q. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part II. Study of the granular structure of starch. **Starch/Stärke**, v. 40, p. 29–32, 1988.

FREI, M., SIDDHURAJU, P., BECKER, K. Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v. 83, p. 395–402, 2003.

FUKUSAKI, E., KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 347–354, 2005.

GALLANT, D. J., BEWA, H., BUY, Q. M., BOUCHET, B., SZYLIT, O., & SEALY, L. On the ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. **Starch/Stärke**, v. 30, p. 255–262, 1982.

GOMAND, S. V., LAMBERTS, L., DERDE, L. J., GOESAERT, H., VANDEPUTTE, G. E., GODERIS, B., VISSER, R.G.F. DELCOUR, J.A. Structural properties and gelatinization characteristics of potato and

cassava starches and mutants thereof. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 307–317, 2010.

HANSON, A. B. ChemoSpec: An R Package for Chemometric Analysis of Spectroscopic Data and Chromatograms (Package Version 1.51-0), 2012.

HAYAKAWA, K. Quality characteristics of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): properties of starch gelatinization and retrogradation. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 576-580, 1997.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 253-267, 2001.

ITIOLA, O. A., AMOO, O. A. Effects of cassava starch and gelatin on the compressional characteristics of a paracetamol tablet formulation. **Nigerian Journal. Science**, v. 32, p. 83–87, 1998.

ITIOLA, O.A., ODEKU, O.A. Packing and cohesive properties of some locally extracted starches. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 363-368, 2005.

JUHÁSZ, R.; SALGÓ, A. Pasting behavior of amylose, amylopectin and their mixtures as determined by RVA curves and first derivatives. **Starch/Stärke**, v. 60, p. 70–78, 2008.

KAUSHAL, KUMAR, V., SHARMA, H.K. Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 59-68, 2012.

KUHNEN, S., OGLIARI, J. B., DIAS, P. F., BOFFO, E. F., CORREIA, I., FERREIRA, A. G., DELGADILLO, I., MARASCHIN, M. ATR-

FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, p. 1673–1681, 2010.

LAMBERT, J.B., SHURVELL, H.F., LIGHTNER, D.A., COOKS, R.G. **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 2001.

LEACH, H.W., MCCOWEN, L.D., SCHOCH, T.J. Structure of the starch granule I. Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, v. 36, p. 534-544, 1959.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 579-588, 2007.

LOPEZ-RUBIO, A., FLANAGAN, B. M., GILBERT, E. P., GIDLEY, M. J. A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: A combined XRD and NMR study. **Biopolymers**, v. 89, p. 761–768, 2008.

LIU, Q. Understanding starches and their role in foods. In: CUI, S. W. (ed). **Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications**. Boca Raton: CRC Press, p. 309-305, 2005.

MARCON, M. J. A., AVANCINI, S. R. P., AMANTE, E. R. Propriedades Químicas e Tecnológicas do Amido de Mandioca e do Polvilho Azedo. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil, 2007.

McCREADY, R. M., HASSID, W.F. The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65, p. 115, 1943.

MORGAN, J. E., WILLIAMS, P. C. Starch damage in wheat flours: a comparison of enzymatic, iodometric, and near-infrared reflectance techniques. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 200-212, 1995.

MOORTHY, S. N. Effect of different types of surfactants on cassava starch properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 1227-1232, 1985.

MORRISON, W. R., SCOTT, D. C., KARKALAS, J. Variation in the composition and physical properties of barley starches. **Starch/ Stärke**, v. 38, p. 374-379, 1986.

MORRISON, W. R., TESTER, R. F. Properties of damage starch granules. Crystallinity, molecular order and gelatinization of ball-milled starches. **Journal of Cereal Science**, v. 19, p. 209-217, 1994.

MUTUNGI, C., PASSAUER, L., ONYANGO, C., JAROS, D. ROHM, H. Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in Raman spectra with X-ray diffraction and ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 598-606, 2012.

NASSAR, N., ORTIZ, R. Melhorar a mandioca e alimentar os pobres. **Scientific American Brasil**, p. 72-77, 2010.

NIBA, L. L., BOKANGA, M. M., JACKSON, F. L., SCHILMME, D. S., LI, B. W. Physicochemical properties and starch granular characteristics of flour from various *Manihot esculenta* (cassava) genotypes. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1701-1705, 2002.

NUNES, L. B., SANTOS, W. J., CRUZ, R. S. Rendimento de extração e caracterização química e funcional de féculas de mandioca da região do semi-árido baiano. Alimentos e Nutrição. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 20, p. 129-134, 2009.

PERONI, F. H. G., ROCHA, T. S., FRANCO, C.M.L. Some structural and Physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 505-513, 2006.

PIFFERI, G., SANTORO, P., PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. **Farmaco**, v, 54, p. 1–14, 1999.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2010.

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G. Química dos Alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2004.

RICKARD, J. E., ASAOKA, M., BLANSHARD, J. M. V. The physical-chemical properties of cassava starch. **Tropical Science**, v. 31, p. 189-207, 1991.

ROLLAND-SABATÉ, A., SÁNCHEZ, T., BULÉON, A., COLONNA, P., JAILLAIS, B., CEBALLOS, H., DUFOUR, D. Structural characterization of novel cassava starches with low and high amylose contents in comparison with other commercial sources. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 161–174, 2012.

ROSENTHAL, F. R. T., NAKAMURA, T., ESPINDOLA, A. M. C., JOCHIMEK, M. R. Structure of starch granules. **Die Stärke**, v. 26, p. 50–55, 1974.

RUBENS, P., SNAUWAERT, J., HEREMANS, K. STUTE, R. In situ observation of pressure-induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 231-235, 1999.

SALIJATA, M. G. SINGHAL, R. S. KULKARNI, P. R. Resistant Starch – A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 1-17, 2006.

SÁNCHEZ, T., DUFOUR, D., MORENO, X., CEBALLOS, H. Comparison of pasting and gel stabilities of waxy and normal starches from potato, maize, and rice with those of a novel waxy cassava starch under thermal, chemical, and mechanical stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5093–5099, 2010.

SÁNCHEZ, T., MAFLA, G., MORANTE, N., CEBALLOS, H., DUFOUR, D., CALLE, F. Screening of starch quality traits in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Starch/Stärke**, v. 61, p. 12–19, 2009.

SEVENOU, O., HILL, S.E., FARHAT, I.A. MITCHELL, J.R. Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 79–85, 2002.

SILVERSTEIN, R.M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SODHI, N. S., GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. Review. **Food Chemistry**, v. 81, p. 219-231, 2003.

SRIROTH, K., SANTISOPASRI, V., PETCHALANUWAT, C., KUROTJANAWONG, K., PIYACHOMKWAN, K., OATES, C. G. Cassava starch granule structure function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 161-170, 1999.

THARANATHAN, R.N. Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, p.65-84, 2002.

THOMAS, D. J., ATWELL, W. **Practical for guides the food industry-** Starch Saint Paul: Egan. Press, 1999.

UARROTA, V.G., AMANTE, E.R., DEMIATE, I.M., VIEIRA, F., DELGADILLO, I., MARASCHIN, M. Physicochemical, thermal, and pasting properties of flours and starches of eight Brazilian maize landraces (*Zea mays* L.). **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 614-624, 2013.

VAN SOEST, J.J.G., TOURNOIS, H., WIT, DE D., Vliegenthart, J.F.G. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fouriertransform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 279, p. 201-214, 1995.

VEIJ, M., VANDENABEELE, P., DE BEER, T., REMONC, J. P., MOENS, L. Reference database of Raman spectra of pharmaceutical excipients. **Journal of Raman Spectroscopy**, v, 40, p. 297–307, 2009.

WALTER, M, SILVA, L. P., EMANUELLI T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 974-980, 2005.

WANG, L. Z., WHITE, P. J. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. **Cereal Chemistry**, v.71, p. 263-268, 1994.

WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. San Diego: Academia Press, 1997.

WHISTLER, R.L. PASCHAL, E. F. **Starch: Chemistry and Technology**. Fundamental Aspects. Academic Press, N. Y. and London, v. 1, 1965.

WILLIAMS, P. C., KUZINA, F. D., HLYNKA, I. A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flours. **Cereal Chemistry**, v. 7, p. 412-420, 1970.

WILSON, R.H., BELTON, P. S. A Fourier-transform infrared study of wheat starch gels. **Carbohydrate Research**, v. 180, p. 339–344, 1988.

ZAMBRANO, F., CAMARGO, C. R. O, TAVARES, D. Amido de mandioca modificado comparado com substitutos de gordura comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 155-161, 2001.

ZOBEL, H. F. X-ray analysis of starch granules. In Whistler, R. L. (ed.). **Methods in Carbohydrates Chemistry**, v. 4, p. 109-143, 1964.

APÊNDICES

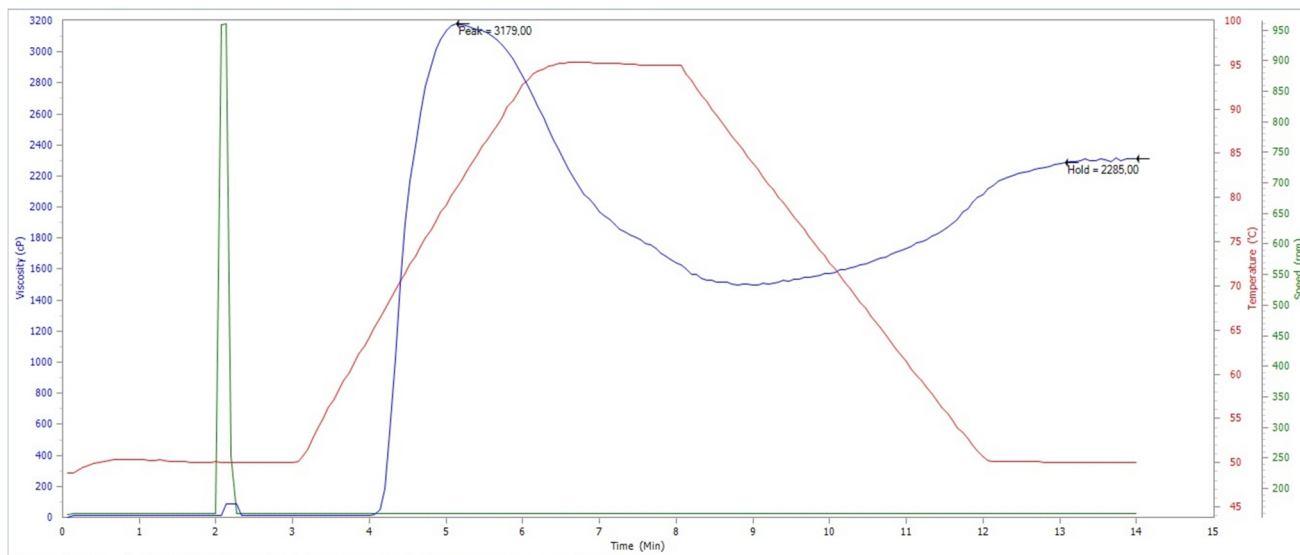


Figura suplementar 1 - Viscoamlograma típico dos amidos de mandioca estudados.

Tabela suplementar 1- Contribuições fatoriais (*loadings*) da análise de componentes principais para as variáveis físico-químicas e funcionais dos amidos de mandioca estudados.

	PC1	PC2	PC3
Eficiência de extração	-0.225	-0.104	-0.318
Conteúdo de amilose	-0.071	0.439	0.026
Densidade do grânulo	0.298	-0.172	-0.437
Adsorção lipídica	-0.319	-0.182	0.392
Adsorção de água	-0.152	0.055	-0.628
Tamanho do grânulo	-0.281	-0.299	0.027
Poder de Inchamento	0.382	0.103	0.001
Cristalinidade (DRX)	0.194	-0.406	0.117
Cristalinidade (FTIR)	-0.261	-0.410	0.129
Temp. de empastamento	-0.079	0.288	0.006
Viscosidade máxima	-0.416	0.204	-0.113
<i>Breakdown</i>	-0.466	0.065	-0.136
<i>Setback</i>	-0.009	0.407	0.307

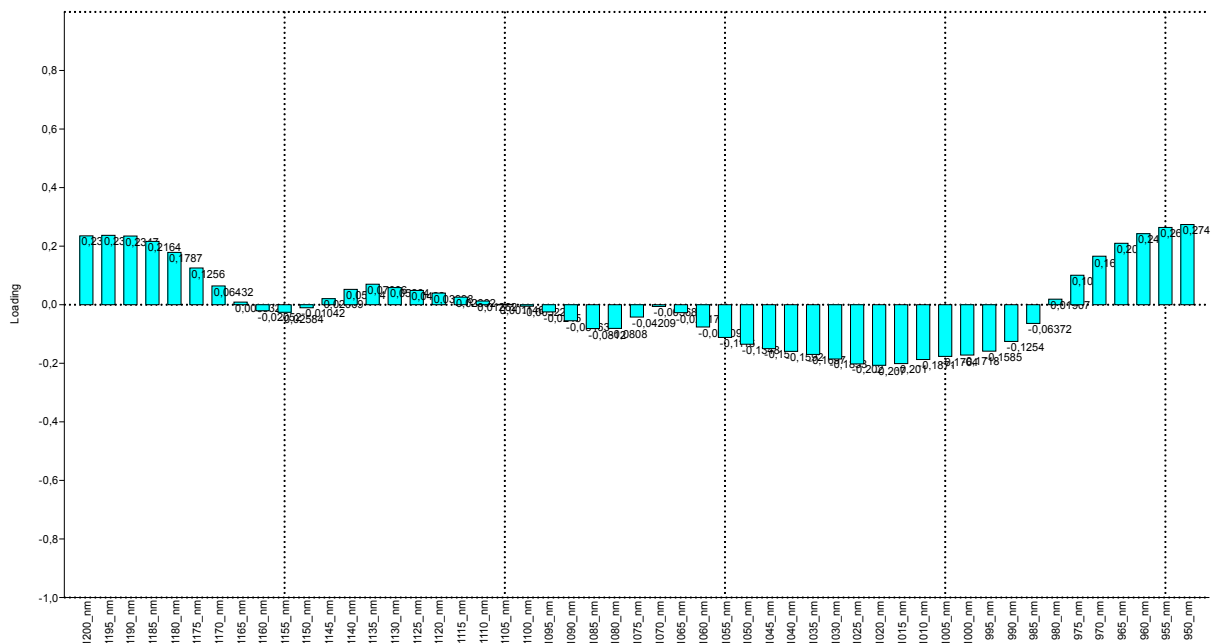


Figura suplementar 2- loadings do componente principal 2 (PC2) para os dados espectrais ATR-FTIR (1200-950 ondas.cm⁻¹).

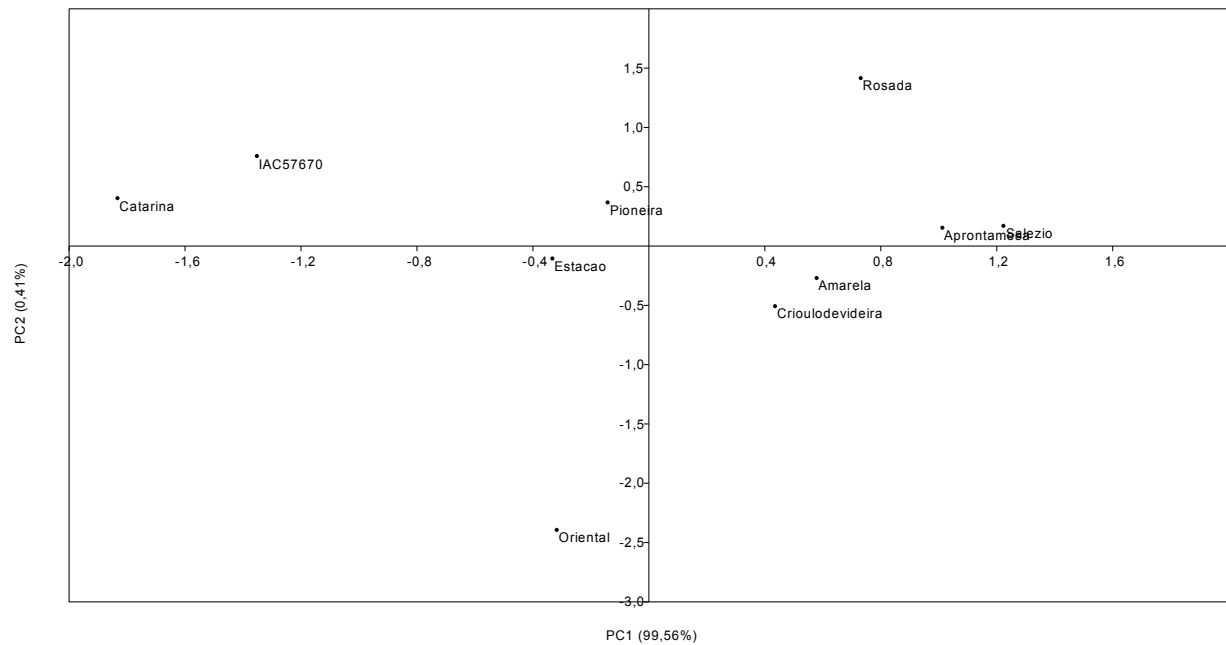


Figura suplementar 3 - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de ATR-FTIR (3000-2800 ondas.cm⁻¹) dos amidos de mandioca estudados.

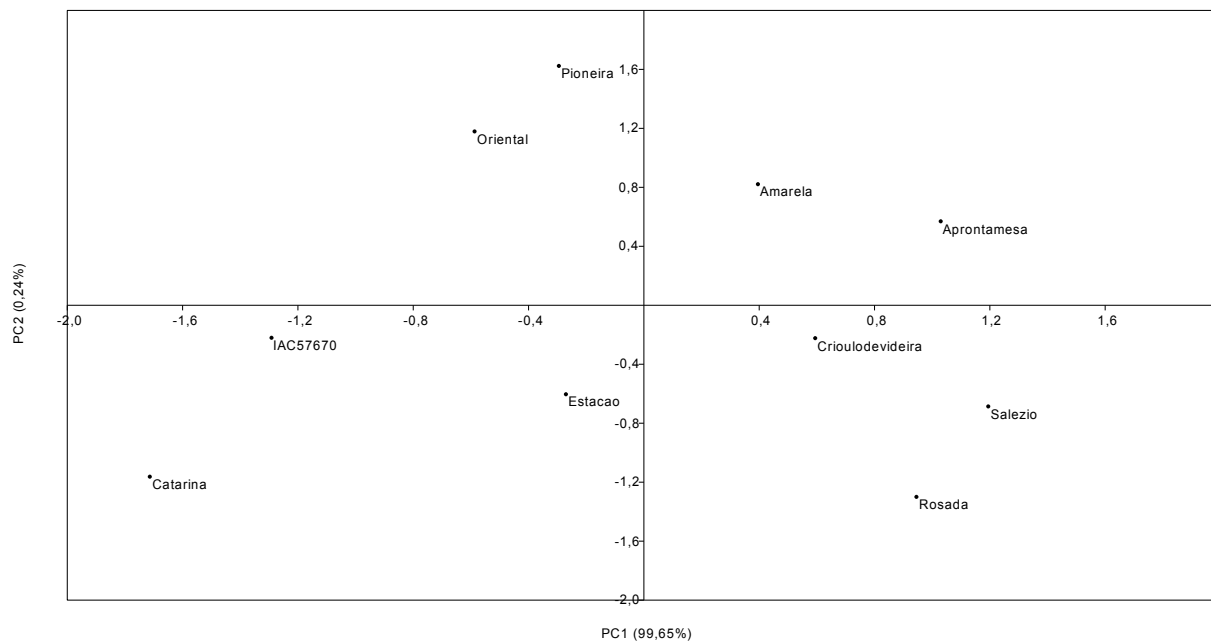


Figura suplementar 4 – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de ATR-FTIR (1650-1500 ondas.cm⁻¹) dos amidos de mandioca estudados

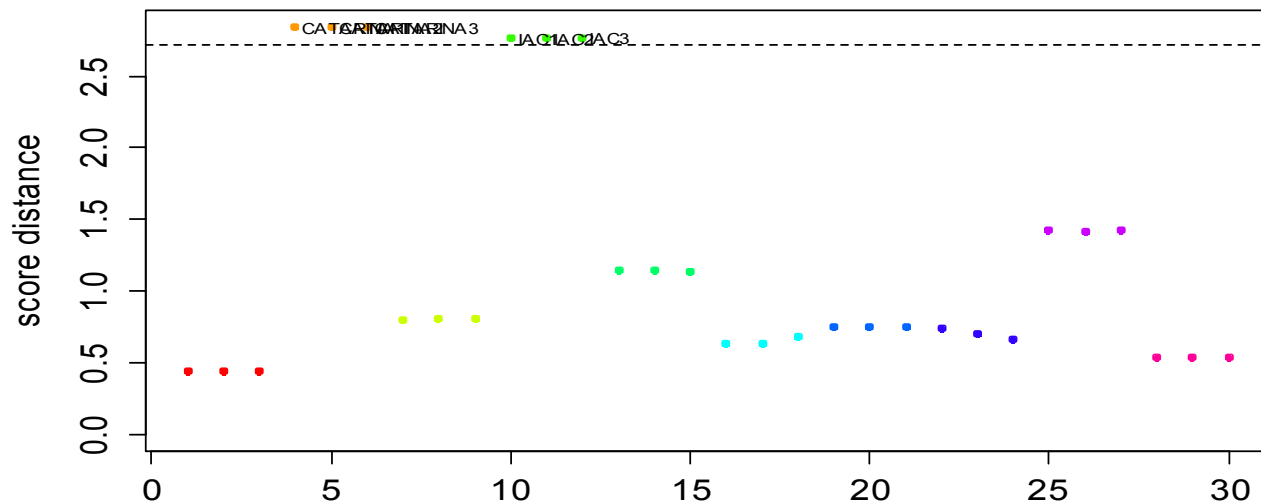


Figura suplementar 5 – Possíveis *outliers* detectados com base no cálculo da distância entre os *scores* da PCA. IAC e Catarina claramente representam perfis espectrais diferentes ao universo amostral analisado.

Script implementado em R para análises das características físico-químicas e funcionais avaliadas:

```
# *****  
# Localização do diretório  
# *****  
setwd("C:/Users/Windows/Documents/Mestrado Biologia Vegetal/Dados  
para o R")  
getwd()  
library(vegan)  
# *****  
# Importação de dados  
# *****  
dadosamido <- read.table("dadosamido.txt", header=TRUE, dec=",")  
dadosamido  
# *****  
# Transformação dos dados  
# *****  
# por ranging  
dadosamido.range <- decostand(dadosamido, "range", MARGIN=2)  
dadosamido.range  
# estandardizado  
dadosamido.z <- decostand(dadosamido, "standardize", MARGIN=2)  
dadosamido.z  
# Por LOG10  
dadosamido.log10 <- decostand(dadosamido, method="log", logbase=10)#  
usando a função decostand para calcular o log na base 10.  
dadosamido.log10  
# *****  
# Plotando as transformações em gráficos  
# *****  
windows(title="Transformações dados físico-químicos - 3")  
par(mfrow=c(2,3))  
boxplot(dadosamido,  
        las=1, main="Sem transformações",  
        col="bisque")  
boxplot(dadosamido.max,  
        las=1, main="Transformação pelo valor máximo",  
        col="lightgreen")  
boxplot(dadosamido.tot,  
        las=1, main="Transformação pelo total",  
        col="lightblue")  
boxplot(dadosamido.log10,  
        las=1, main="Transformação por log",  
        col="orange")
```

```

boxplot(dadosamido.range,
        las=1, main="Transformação ranging",
        col="lightblue")
boxplot(dadosamido.z,
        las=1, main="Transformação por estandardização",
        col="orange")
#Transformação escolhida: Dados estandardizados. Objetiva-se equalizar
os pesos das variáveis independentes geradas para um melhor
entendimento da magnitude da variação entre as amostras estudadas.
#*****
# carregando pacotes necessários:
#*****
library(ade4)
library(vegan) # deve ser carregado depois de ade4 para evitar conflitos
library(gclus)
library(cluster)
library(FD)
#*****
# Correlação linear de Pearson r entre os dados físico-químicos
#*****
dadosamido.pearson <- cor(dadosamido) # default = "pearson"
dadosamido.pearson
round(dadosamido.pearson, 2)

# Reordenação das variáveis antes de plotar
dadosamido.o <- order.single(dadosamido.pearson)
dadosamido.o
# carregar a função [panelutils()]
source("panelutils.R")
windows(title="Matriz de correlação linear",10,10)
op <- par(mfrow=c(1,1), pty="s")
pairs(dadosamido[,dadosamido.o], lower.panel=panel.smooth,
upper.panel=panel.cor,
      diag.panel=panel.hist, main="Matriz de correlação de Pearson")
par(op)
# *****
# 1. PCA - Analise de Componentes Principais - Dados amido (usando
função do Vegan)
# *****
library(stats)
library(ade4)
library(gclus)
library(ape)
library(vegan)
getwd()

```

```

dadosamido<- read.table("dadosamido.txt", header=TRUE, dec=",")
dadosamido
summary(dadosamido)
# Outra forma de extrair os componentes principais (Função rda do vegan) -
Preferível pelas opções que fornece
dadosamido.rda.pca<- rda(dadosamido, scale=T) # scale = T - matriz de
correlação, scale = F - matriz de covariância
dadosamido.rda.pca
summary(dadosamido.rda.pca)
dadosamido.load <- dadosamido.rda.pca$CA$v #retorna as correlações dos
variáveis originais aos novos componentes (autovetores)
dadosamido.load
biplot(dadosamido.rda.pca, scaling=2, main="PCA - scaling 2") # biplot de
correlação - representa melhor as relações de correlacao entre as variaveis
biplot(dadosamido.rda.pca, scaling=2, main="PCA - scaling 2",
xlab="Componente principal 1 = 45,58%", ylab="Componente principal 2 =
28,27%")
# por sua vez a opcao considerando a melhor representacao de distancias
euclidianas entre amostras e atraves da opcao scaling 1:
biplot(dadosamido.rda.pca, choices=1:2, scaling=1, main="PCA - dados
fisico-quimicos",xlab="PC1 = 34,94%", ylab="PC2 = 22,65%") # biplot de
distancia - representa melhor as distancias euclidianas entre objetos
# Examinar e plotar resultados parciais do PCA (adaptado de Borcard et al
2011)
# Autovalores
dadosamido.eig <- dadosamido.rda.pca$CA$eig
dadosamido.eig
# Aplicando o criterio de Kaiser-Guttman para a selecao de eixos (veja
Borcard et al 2011)
dadosamido.eig[dadosamido.eig > mean(dadosamido.eig)]
# Modelo de Broken stick (vara-quebrada) para estudo dos componentes
significativos para analise:
n <- length(dadosamido.eig)
bsm <- data.frame(j=seq(1:n), p=0)
bsm$p[1] <- 1/n
for (i in 2:n) {
  bsm$p[i] = bsm$p[i-1] + (1/(n + 1 - i))
}
bsm$p <- 100*bsm$p/n
bsm
# gráfico resultante da analise (veja a linha de corte)
# Plotar os autovalores e as %s de variancia de cada eixo
windows(title="Autovalores de PCA")
par(mfrow=c(2,1))
barplot(dadosamido.eig, main="Autovalores", col="bisque", las=2)

```

```

abline(h=mean(dadosamido.eig), col="red") # Media dos autovalores
legend("topright", "Media de autovalores", lwd=1, col=2, bty="n")
barplot(t(cbind(100*dadosamido.eig/sum(dadosamido.eig), bsm$p[n:1])),
beside=TRUE,
      main="% de variancia", col=c("bisque",2), las=2)
legend("topright", c("% de variancia", "Modelo de vara-quebrada"),
      pch=15, col=c("bisque",2), bty="n")
#*****
# 2. PCA - dadosamido (Usando a função princomp)
#*****
library(vegan)
dadosamido<- read.table("dadosamido.txt", header=TRUE, dec=",")
dadosamido
# PCA
dadosamido<- read.table("dadosamido.txt", header=TRUE, dec=",")
dadosamido
summary(dadosamido)
names(dadosamido)
dadosamido.data <-dadosamido
dadosamido.data
dadosamido.data.pca <- princomp(dadosamido.data, cor=TRUE) # usando
matriz de correlação
# dadosamido.data.pca <- princomp(dadosamido.data) # usando matriz de
covariância
summary(dadosamido.data.pca)
loadings(dadosamido.data.pca) #retorna as correlações das variáveis
originais aos novos componentes (autovetores)
dadosamido.data.pca$loadings
plot(dadosamido.data.pca)
biplot(dadosamido.data.pca,var.axes=TRUE, xlab="Componente principal 1
= 40%", ylab="Componente principal 2 = 31,6%", expand = 0.75, arrow.len
= 0.05)
dadosamido.data.pca$scores
screeplot(dadosamido.data.pca) ## identico com plot()
screeplot(dadosamido.data.pca, npcs=4, type="lines")
dadosamido.data.pca$center #veja as medias das variaveis originais
print(summary(dadosamido.data.pca <- princomp(dadosamido.data,
cor=TRUE),
      loadings = TRUE, cutoff = 0.2), digits = 2)
dadosamido.pc1<-predict(dadosamido.data.pca)[,1] # isolar o primeiro
componente (PC 1)
dadosamido.pc2<-predict(dadosamido.data.pca)[,2] # isolar o segundo
componente (PC 2)
par(mfrow=c(1,2))

```

```

#####
# CLUSTER
#####
## Carregar os pacotes para as análises
library(ade4)
library(vegan) # deve ser carregado depois de ade4 para evitar conflitos
               (contem ANOSIM)
library(gclus)
library(cluster)
library(FD)
library(pvclust)
require(graphics)
library(clustsig)

#dadosamido.sem.transf.eucl <- vegdist(dadosamido, method="euclidean",
na.rm=TRUE)
dadosamido.sem.transf.upgma<- hclust(dadosamido.sem.transf.eucl, "ave")
dadosamido.sem.transf.cofen <- cophenetic(dadosamido.sem.transf.upgma)
dadosamido.sem.transf.cofen
cor(dadosamido.sem.transf.eucl, dadosamido.sem.transf.cofen)
plot(dadosamido.sem.transf.upgma, main = "UPGMA")
dadosamido

# UPGMA
dadosamido.transf <- decostand(dadosamido, method="stan", na.rm=TRUE)
dadosamido.transf.eucl <- vegdist(dadosamido.transf,
method="euclidean",na.rm=TRUE)
dadosamido.transf.upgma<- hclust(dadosamido.transf.eucl, "ave")
dadosamido.transf.cofen <- cophenetic(dadosamido.transf.upgma)
dadosamido.transf.cofen
cor(dadosamido.transf.eucl, dadosamido.transf.cofen)
plot(dadosamido.transf.eucl,dadosamido.transf.cofen)
abline(0,1)
lines(lowess(dadosamido.transf.eucl,dadosamido.transf.cofen),col=2)
plot(dadosamido.transf.upgma, main = "UPGMA")
plot(dadosamido.sem.transf.upgma, hang = -1)
osdois <- par(mfrow = c(1, 2))
plot(dadosamido.sem.transf.upgma, main = "Sem transformação - UPGMA")
plot(dadosamido.transf.upgma, main = "Dados transformados - UPGMA")
# WARD
dadosamido.transf.ward<- hclust(dadosamido.transf.eucl, "ward")
dadosamido.transf.cofen.ward <- cophenetic(dadosamido.transf.ward)
dadosamido.transf.cofen.ward
cor(dadosamido.transf.eucl, dadosamido.transf.cofen.ward)
plot(dadosamido.transf.ward, main = "WARD")

```



```

windows(title="Dendrogramas WARD/UPGMA - dadosamido")
osdois <- par(mfrow = c(1, 2))
plot(dadosamido.transf.ward, main = "Dados transformados - WARD")
plot(dadosamido.transf.upgma, main = "Dados transformados - UPGMA")

#### Análise de similaridade de grupos a partir dos grupos formados pela
análise de agrupamento
## Função SIMPROF {CLUSTSIG}
# Vamos agora analisar a significância dos grupos através da análise
SIMPROF.
# instale o pacote {clustsig}
library(clustsig)
dadosamidoSIMPROF <- simprof(data=dadosamido.transf,
method.distance="euclidean") # vai demorar um pouco...
dadosamidoSIMPROF
simprof.plot(dadosamidoSIMPROF) # veja o gráfico resultante
simprof.plot(dadosamidoSIMPROF, leafcolors=NA, plot=TRUE, fill=TRUE,
leaflab="perpendicular", siglinetype=2)
simprof.plot(dadosamidoSIMPROF, leafcolors=NA, plot=TRUE, fill=TRUE,
leaflab="perpendicular", siglinetype=4)

```

Script implementado em R à análise quimiométrica dos dados espectrais de infravermelho:

```
# *****  
# Localização do diretório  
# *****  
setwd("C:/Users/Windows/Documents/Mestrado Biologia Vegetal/Dados  
para o R")  
getwd()  
## *****  
# carregando pacotes necessários:  
## *****  
library(gsubfn)  
library(R.utils)  
library(ChemoSpec)  
source("readJDX.R")  
source("files2SpectraObject.R") # cria um R file  
files2SpectraObject(format = "dx", gr.crit = c("AMARELA", "CATARINA",  
"ESTACAO", "IAC", "MESA", "ORIENTAL", "PIONEIRA", "ROSADA",  
"SALEZIO", "VIDEIRA"),  
freq.unit = "Wavenumber", int.unit = "transmittance", descrip = "Cassava",  
out.file = "Cassava",  
gr.cols = rainbow(10, s = 1, v = 1, start = 0, end = max(1,9)/10, alpha = 1)) #  
10 é o numero de amostras  
Cassava <- loadObject("Cassava.RData")  
data(cassava.2$freq) # makes the data available  
sumSpectra(Cassava)  
cassava.2 = removeFreq(Cassava, rem.freq=Cassava$freq > 3000 |  
Cassava$freq < 600)  
cassava.2$freq  
plotSpectra(cassava.2, title = "Genótipos de mandioca",  
which = c(1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28), yrange = c(-0.8, 1e10), offset =  
0.8, amp = 30.0, lab.pos = 3600)  
hcaSpectra(cassava.2, title = "Genótipos de mandioca")  
class <- classPCA(Cassava, choice = "noscale")  
plotScores(cassava.2, title = "Genótipos de mandioca",  
class, pcs = c(1, 2), ellipse = "none", tol = TRUE, cex=2)  
robust <- robPCA(cassava.2, choice = "noscale") # metodo robusto de pca  
plotScores(cassava.2, title = "Genótipos de mandioca", robust, pcs = c(1, 2),  
ellipse = "none", tol = 0.01)  
diagnostics <- pcaDiag(cassava.2, robust, pcs = 2, plot = "OD")  
diagnostics <- pcaDiag(cassava.2, robust, pcs = 2, plot = "SD")  
plotScree(robust, title = "Genótipos de mandioca")  
plotScree2(robust, title = "Genótipos de mandioca")
```

```

out <- pcaBoot(cassava.2, pcs = 5, choice = "noscale") # pca na forma de
histograma
plotScores3D(cassava.2, robust, title = "Genótipos de mandioca", ellipse =
FALSE, cex = 8) # 3d espectro
plotLoadings(Cassava, robust, title = "Genótipos de mandioca",
loads = c(1, 2, 3), ref = 1) # plotar loadings
plot2Loadings(cassava.2, robust, title = "Genótipos de mandioca",
loads = c(1, 2), tol = 0.002) # loadings de outra forma
spt <- sPlotSpectra(cassava.2, robust, title = "Genótipos de mandioca",
pc = 1, tol = 0.001) # qual variavel tem mais influencia?
spt <- sPlotSpectra(cassava.2, robust, title = "Detalhe dos espectros de
mandioca",
pc = 1, tol = 0.05, xlim = c(-0.04, -0.01), ylim = c(-1.05,
-0.9))
hcaScores(Cassava, robust, scores = c(1:5),
title = "Genótipos de mandioca") # fazer HCA sobre PCA, ja limpo
library(mclust)
model <- mclustSpectra(Cassava.2, robust, plot = "BIC",
title = "Genótipos de mandioca")
model <- mclustSpectra(Cassava.2, robust, plot = "proj",
title = "Genótipos de mandioca")
model <- mclustSpectra(Cassava.2, class, plot = "errors",
title = "Genótipos de mandioca", truth = Cassava$groups)

```

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE CAROTENOIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RAÍZES DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL, CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E QUIMIOMETRIA E INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE COZIMENTO NA RETENÇÃO DE CAROTENOIDES.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a mandioca ocupa a posição de terceira cultura mais importante, como fonte de calorias na alimentação mundial dentre o grupo das culturas alimentícias básicas, que inclui o arroz e o milho (FAO, 2012). É uma cultura adaptável e vigorosa, sendo consumida principalmente em regiões onde prevalecem a seca, a pobreza e a desnutrição. Os transtornos relacionados com a carência de vitamina A estão entre os principais problemas nutricionais dos países em desenvolvimento. É estimado que 190 milhões de crianças em idade pré-escolar possuam baixa atividade de retinol no plasma ($<0.70 \mu\text{mol.L}^{-1}$), sintoma subclínico da deficiência (WHO, 2012). A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é considerada um alimento tradicional para muitas populações com risco de deficiência de vitamina A, sendo produzida predominantemente em pequena escala por agricultores com recursos limitados. Na mandioca, o β -caroteno é o carotenoide majoritário com atividade provitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008), porém, concentrações de carotenoides em raízes de mandiocas tipicamente brancas (mais comumente encontradas nestas populações) são baixas, em torno de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco e $3 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco (IGLESIAS *et al.*, 1997). Sabe-se, contudo, que raízes com coloração amarela apresentam alta correlação com o teor de carotenoides totais e na busca de materiais com maior atividade provitamina A, como estratégia para reduzir a prevalência de deficiência desta vitamina, tem-se identificado genótipos com mais de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de β -caroteno/g de peso fresco (CHAVEZ *et al.*, 2005). Para minimizar a deficiência desta vitamina, ainda é necessário que os carotenoides presentes nas raízes consumidas sejam eficientemente absorvidos e biotransformados. Portanto, a análise da estabilidade dos carotenoides nas raízes submetidas ao processo de cozimento, principal aplicação dos genótipos em estudo, deve ser

considerada. A retenção é um importante componente para definir o conteúdo final de carotenoides nas raízes que serão consumidas (CHAVÉZ *et al.*, 2007).

Além do β -caroteno, em *M. esculenta* também são encontrados outros carotenoides como o licopeno e as xantofilas luteína e β -criptoxantina de reconhecidos benefícios, atuando como agentes antioxidantes, redução do risco de degeneração macular associada à idade e à catarata, além de reduzir o risco de alguns tipos de cânceres (STAHL & SIES, 2003). Embora a presença de compostos fenólicos seja principalmente relatada durante a deterioração fisiológica pós-colheita, a presença desses metabólitos, em menores concentrações, também é detectada nas raízes frescas, constituindo uma importante fonte de compostos à saúde humana. Contudo, constata-se um reduzido número de trabalhos científicos de caracterização da composição fenólica em raízes de mandioca com vistas ao consumo humano.

Neste contexto, a obtenção e/ou seleção de “novos” genótipos de mandioca, particularmente de mesa (baixos teores de ácido cianídrico), poderia desempenhar um papel de maior relevância para a segurança alimentar brasileira e mundial, como fonte provedora de nutrientes e componentes nutraceuticos. Este aspecto, segundo Maziya-Dixon (2000), reveste-se de alta importância em relação às populações com acesso limitado a alimentos. Afora a extrema relevância dos aspectos nutricionais e inúmeras possibilidades de aplicação na indústria, ressalta-se ainda que em termos agronômicos a mandioca possui outras características como a facilidade de plantio e manejo, colheita e baixíssimo custo de produção/manutenção, boa produtividade e tolerância a condições limitantes de solo e seca e resistência a ataques de insetos e doenças (MONTAGNAC, DAVIS, TANUMIHARDJO, 2009), além do fato das raízes poderem permanecer no solo até o momento do consumo. Em seu conjunto, as peculiaridades de *M. esculenta* a tornam uma cultura estratégica contra a fome/desnutrição e suas consequências patológicas às populações mais pobres dos países em desenvolvimento.

Em razão da grande importância da cultura da mandioca para o país, foram criados e vêm sendo mantidos diversos bancos de germoplasma e coleções de trabalho de mandioca com a finalidade de conservar e preservar cultivares comerciais, etnovarietades tradicionais e genótipos selvagens de *Manihot* spp (FUKUDA & GUEVARA, 1998). Estes bancos e coleções de germoplasma conservam a variabilidade genética, visando evitar a perda de genes ou de

combinações gênicas, assegurando uma ampla base genética para programas de melhoramento. Outra finalidade dos bancos é a coleta de material cultivado e silvestre, a caracterização botânica, agrônômica e a responsabilidade de promover a introdução e intercâmbio destes recursos (FUKUDA, 1996).

Neste contexto, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), através da Estação Experimental de Urussanga (EEUr), situada no Sul do Brasil, mantém um banco de germoplasma de mandioca com acessos genéticos oriundos de outras instituições de pesquisa do Brasil e internacionais para apoio ao seu programa de melhoramento genético. Além desses, a empresa agregou em torno de 200 acessos de mandioca de mesa especificamente, oriundos de coletas realizadas por seu grupo de pesquisa em diversas localidades do Estado de Santa Catarina, os quais são mantidos “*on farm*” por pequenos produtores familiares. Esta coleção de trabalho ao longo dos últimos anos tem sido avaliada com base em caracteres eminentemente agrônômicos (produção/produktividade, adaptação, resistência a pragas e/ou doenças), morfofisiológicos e também de alguns aspectos culinários. No entanto, destaca-se a quase total escassez de informações sobre a composição química e o valor nutricional destes genótipos.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi iniciar um processo de caracterização metabólica, com ênfase inicial na composição carotenóidica de genótipos (etnovarietades) de mandioca de mesa pertencentes ao banco de germoplasma da Estação Experimental da Epagri de Urussanga-SC. Uma abordagem analítica usual em avaliações bioquímicas foi adotada como ferramenta de suporte à orientação e seleção de novas variedades, determinando os benefícios e potenciais de uso de cada material e, conseqüentemente, a necessidade de manutenção e conservação dos recursos genéticos existentes.

No presente estudo foram analisadas amostras de dez genótipos de mandioca por espectrofotometria UV-visível e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, visando determinar o perfil carotenóidico destas amostras frescas e analisar os efeitos (retenção, isomerização) após o processamento (cozimento). Subseqüentemente, a matriz de dados quantitativos foi utilizada à construção de modelo descritivo através do cálculo dos componentes principais (PCs), buscando a detecção de grupos genotípicos semelhantes quanto à variável em estudo.

Assume-se que estudos que revelem características nutricionais e eventuais benefícios à saúde humana desses genótipos possam lhes agregar valor, amenizando o quadro de baixo retorno econômico associado ao seu cultivo. Além disso, este estudo desenvolve e aplica abordagens biotecnológicas como ferramentas de apoio ao programa de melhoramento genético da Epagri, com a utilização de marcadores bioquímicos, i.e., carotenos ou xantofilas, de seleção e identificação de genótipos promissores e/ou potenciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 GERMOPLASMA

Neste estudo foram avaliados dez genótipos de mandioca oriundos do Banco de Germoplasma do Programa de melhoramento genético de mandioca da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri - Estação Experimental de Urussanga - EEUR). Os parâmetros agronômicos de seleção e propriedades organolépticas destes genótipos, já foram amplamente avaliados pela equipe de pesquisadores da Epagri, conferindo a estes 10 genótipos as melhores indicações ao cultivo e consumo no estado de Santa Catarina, Brasil. Os genótipos Apronta mesa, Pioneira, Oriental, Amarela, Catarina, IAC 576-70, Salézio, Estação, Crioulo de Videira e Rosada apresentaram resultados satisfatórios em avaliações como: produção/produtividade (número de raízes, refugos, peso – t/ha), resistência a pragas e doenças, altura da planta, facilidade de arranquio, facilidade de despenca, presença de fiapos nas raízes, cor da entrecasca, cor da polpa “*in natura*”, facilidade de descasque, tempo de cozimento, cor dos toletes cozidos, pontos brancos nos toletes, entre outros.

O genótipo Rosada [

Figura 21 (B-C)] é resultante do trabalho de identificação e seleção da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) em parceria com várias instituições de pesquisa e ensino do Brasil. Este genótipo foi identificado no sudoeste do estado da Bahia e destaca-se dos demais por sua riqueza em carotenoides nas raízes, representado principalmente pelo licopeno. A coloração rosada é um indicativo da presença dessa substância nas raízes (FUKUDA & PEREIRA, 2006).

A mandioca IAC 576-70 [

Figura 21 (A-B)] é resultado de pesquisas iniciadas na década de 1970 pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) na busca por variedades de mandioca mais nutritivas, resistentes a doenças e com maior produtividade. Para o desenvolvimento da variedade IAC 576-70 foi utilizado o método de melhoramento genético clássico, onde são selecionadas as plantas com as características buscadas e cruzadas para obtenção da variedade de interesse.

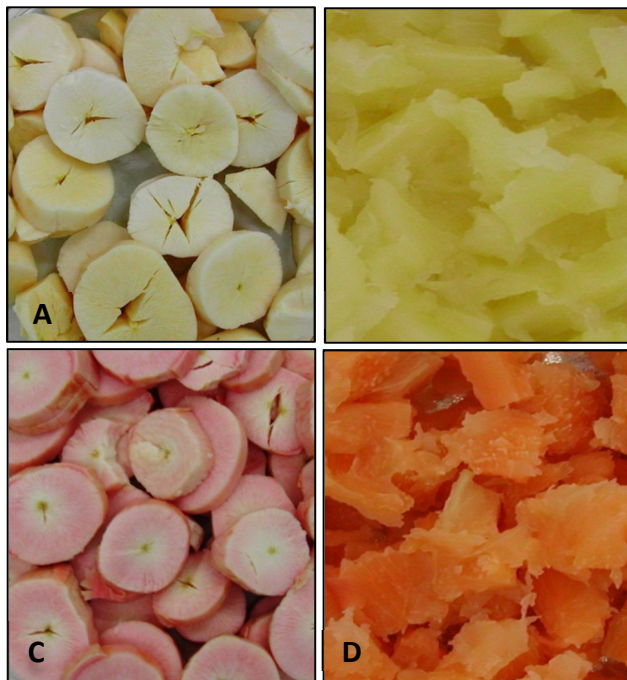


Figura 21- Genótipos IAC-576-70 (A e B) e BRS Rosada (C e D). Raízes frescas (A e C) e cozidas (B e D), respectivamente.

Todos os genótipos deste estudo pertencem à categoria mesa por apresentarem baixos teores de glicosídeos cianogênicos, que conferem toxicidade à planta. Foram produzidas na safra 2010/2011 na Estação Experimental da EPAGRI, no município de Urussanga – SC.

Para obtenção de biomassa seca de raiz, segmentos do tecido parenquimático daquele órgão (raízes descascadas, sem felema e sem entrecasca) foram cortados em cubos (2 cm de lado), identificados e secos em estufa com ventilação forçada, a 45°C, até peso constante. Para a obtenção de massa cozida, 200 g de amostras foram cortadas, transversalmente ao sentido do comprimento, em pedaços de aproximadamente 5 cm, e cozidas completamente imersas em 1 litro de água destilada em ebulição (~98°C), durante 30 minutos, em panela de aço inoxidável com tampa. Após o cozimento, os segmentos foram

drenados e secos em estufa com ventilação forçada, a 45°C, até peso constante.

As amostras desidratadas foram pulverizadas em moinho de café (Cadence MDR 301) e padronizadas à granulometria de 60 mesh. As amostras em pó foram embaladas em frasco de vidro com tampa e armazenadas em local fresco, seco e ao abrigo da luz, para posterior análise.

2.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS

Os carotenoides foram extraídos conforme descrito por Rodriguez-Amaya & Kimura (2004). A 5 g de raízes frescas e cozidas foram adicionados 10 ml de acetona, incubando-se por 10 min. Ao meio de reação, 10 ml de éter de petróleo foram adicionados, as amostras foram homogeneizadas (1 min) com auxílio de Ultra-turrax (IKA Janke & Kunkel – T25 basic) e centrifugadas (Eppendorf 5810R) a 3000 rpm/10 min., a 10°C. A fase orgânica foi coletada e a extração repetida com o resíduo com 5 ml de acetona e 5 ml de éter de petróleo, seguida de centrifugação. À fase orgânica acrescentaram-se 10 ml de solução de NaCl 0,1M, seguido de centrifugação (300 rpm/7 min., 10°C). Este processo de lavagem foi repetido duas vezes e a fase aquosa extraída manualmente com pipeta Pasteur. Éter de petróleo foi adicionado aos extratos ajustando-se o volume em 15 ml para subsequente análise via espectrofotometria de varredura UV-visível (200 - 700 nm, LGS 53). O teor de carotenoides totais foi determinado através da leitura da absorbância a 450 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de β -caroteno em éter de petróleo ($2592 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004) e a fórmula de Lambert-Beer, expressando-se os valores em μg de carotenoides/g de amostra (peso seco) (DAVIES, 1976).

2.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CAROTENOÍDICO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para as determinações por CLAE, a fração organossolvente usada à quantificação espectrofotométrica, foi concentrada em fluxo de nitrogênio e o extrato concentrado totalmente dissolvido em 1 ml de hexano. Aliquotas (10 μl) desta solução foram centrifugadas

(10000rpm/10min), filtradas (0,22 µm) e injetadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com termostatizador (35°C), coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54) acoplada à pré-coluna (C18, Vydac 201TP54) e detector espectrofotométrico (450 nm). A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90: 10, v/v), fluxo de 1 mL/min e a identificação dos compostos de interesse foi efetuada por comparação dos tempos de retenção de amostras de compostos padrões puros, sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenóides utilizou curva padrão externa (Sigma-Aldrich, MO-USA - β-caroteno $y = 1,019x$, $r^2 = 0,99$; luteína e β-criptoxantina $y = 7044,96x$, $r^2 = 0,99$; licopeno $y = 4096,947x$, $r^2 = 0,98$), considerando-se os valores de áreas dos picos de interesse para efeitos de cálculos das concentrações dos analitos.

2.4 ANÁLISE DA RETENÇÃO DE CAROTENÓIDES

A retenção de carotenoides nas raízes dos genótipos após o processo de cozimento foi calculada usando a fórmula (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004):

$$\text{Retenção (\%)} = \frac{\text{conteúdo de carotenoides por g de alimento processado}}{\text{conteúdo de carotenoides por g de alimento cru}} * 100$$

2.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Amostras (1g de peso seco) foram adicionadas de 10 ml de metanol-HCl (1%, v/v) e levadas em banho-maria por 30 minutos a 40°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm, 15min.) e o sobrenadante empregado para as subseqüentes análises.

2.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado via espectrofotometria UV-vis, utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método proposto por Rumbaoa *et al.*, (2009). O reativo de Folin-Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (cor amarela); porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis (Huang *et al.*, 2005).

A 200 µl do extrato metanol-HCl (1%) foi adicionado 1,4 ml de água destilada/deionizada e 100 µl do reativo Folin-Ciocalteu. Após 30s (não excedendo 8 minutos), 300µl de solução de Na₂CO₃ (20%, m/v) foram adicionados e misturados em vórtex. Esta solução permaneceu em repouso por 2 horas para posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-vis (Gold spectrum lab 53 UV-Vis spectrophotometer, BEL photonics, Brazil), a 765 nm. Os valores de concentração foram calculados com auxílio de curva-padrão externa (ácido gálico - Sigma, 10 a 100 ppm, $y = 0,0069x$, $r^2 = 0,9987$) e os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido gálico/g de amostra.

2.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para a identificação dos compostos fenólicos no extrato metanólico acidificado uma alíquota de 10 µL de amostra foi analisada em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C₁₈ (Shim-Pack CLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm Ø) e detector espectrofotométrico UV-visível operando em 280 nm. A eluição utilizada consistiu de H₂O: AcOH: *n*-BuOH (350: 1: 10, v/v/v), com fluxo de 0,8 mL/min e a identificação dos compostos de interesse foi feita com base nos tempos de retenção obtidos a partir da análise de amostras padrões sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos ácidos fenólicos foi feita utilizando-se curva padrão externa de ácido gálico ($y = 19466x$, $r^2 = 0,99$), quercetina ($y = 24466x$, $r^2 = 0,99$), epigallocatequina ($y = 892,75x$, $r^2 = 0,97$), ácido clorogênico ($y = 19815x$, $r^2 = 0,99$), ácido *p*-hidróxibenzóico ($y = 14690x$, $r^2 = 0,99$) e epicatequina galato ($y = 19815x$, $r^2 = 0,96$), tomando como base a área dos picos de interesse. Os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções/amostra, a partir de análises realizadas em triplicata.

2.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (1, 1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL)

A fim de avaliar a capacidade antioxidante, extratos metanólicos das raízes, foram submetidos ao teste do DPPH. Este modelo é baseado na capacidade do radical livre estável 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil em

reagir com substâncias doadoras de hidrogênio ($\text{DPPH}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^\bullet$), incluindo compostos fenólicos (ROGINSKY & LISSI 2005; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998). O consumo de DPPH é, portanto, um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorbância a 517 nm diminui como resultado de uma alteração na coloração, de violeta para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes no extrato através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H.

A metodologia utilizada foi descrita por Kim *et al.*, (2002). Uma alíquota de 290 μL da solução metanólica do radical DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%) foi acrescida de 10 μL da amostra (em metanol 80%). O decréscimo da absorbância em 530 nm foi medido em leitora de microplacas, após 30 minutos de incubação da amostra. A atividade de sequestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \left(\frac{\text{Abs controle} - \text{Abs final da amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100$$

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Dados relativos à quantificação dos metabólitos secundários de interesse foram expressos como a média ($\mu\text{g.g}^{-1}$) \pm desvio padrão e submetidos a técnicas de análise estatística univariada (ANOVA), seguido de teste Tukey ($P < 0,05$), utilizando os pacotes GraphPad Prism 5 e GraphPad Instat 3.06.

Os dados espectrofotométricos (varreduras UV-vis. 200-700 nm) e os dados de quantificação cromatográfica via CLAE foram tratados via técnicas de análise estatística multivariada e quimiometria, através da aplicação dos métodos de componentes principais (PCAs) e *clustering* com a utilização da linguagem estatística R (v.2.15.2) e programas estatísticos PAST versão 2.17c e MVSP 3.1.

Todos os procedimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata ($n=3$) e protegidos da luz para evitar a foto-oxidação dos compostos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de conteúdo médio de carotenoides totais em raízes frescas, determinados por espectrofotometria UV-visível são apresentados na Figura 22. A ampla disparidade no conteúdo de carotenoides observada revela a variabilidade química entre os genótipos analisados.

No presente estudo, as raízes dos genótipos com polpa de coloração branca (Apronta mesa, Oriental, Salézio, Estação e Crioulo de Videira) apresentaram as menores concentrações de carotenoides totais ($1,38 \pm 0,75$ a $5,02 \pm 1,27 \mu\text{g.g}^{-1}$), enquanto valor superior foi detectado às raízes do genótipo com pigmentação rosada i.e., $169,8 \pm 17,9 \mu\text{g.g}^{-1}$. Genótipos de raízes amarelas (Pioneira, Amarela, Catarina e IAC-576-70) apresentaram concentrações em torno de $18,1 \pm 3,31 \mu\text{g.g}^{-1}$ de carotenoides totais. Estes resultados condizem com dados reportados na literatura que observam uma correlação positiva entre a cor da polpa das raízes e o conteúdo de carotenoides totais (CHAMPAGNE *et al.*, 2010; CHÁVEZ *et al.*, 2005; IGLESIAS *et al.*, 1997).

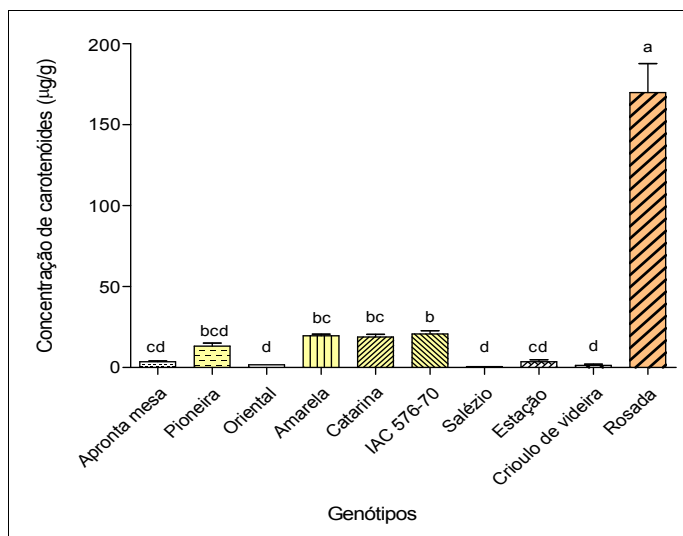


Figura 22 - Concentração de carotenoides totais (médias $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco \pm desvio padrão, $n = 3$) em amostras de raízes de genótipos de *M. esculenta* determinada por espectrofotometria UV-visível (450nm , $\epsilon = 2592 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ($P < 0,05$).

Considerando que a recomendação de ingestão diária de vitamina A é de 900 µg de atividade equivalente de retinol (RAE) para adultos e que cada RAE corresponde a 1 µg de retinol ou 6 µg de β-caroteno (FAO/WHO, 2002), o consumo de 30 gramas do genótipo Rosada atende às recomendações diárias para um adulto. De outra forma, o consumo de 100 g de genótipos amarelos corresponde a aproximadamente 35% da recomendação diária de ingestão de vitamina A.

Carotenoides são destruídos pelo calor, luz e oxigênio e/ou pela combinação entre estes (THAKKAR *et al.*, 2009). O aumento da área superficial por cortar, ralar ou triturar, exposição à luz aumentada, oxigênio e altas temperaturas durante o processamento expõem os compostos carotenóidicos presentes na matriz do alimento à degradação. Para minimizar as consequências da hipovitaminose A em casos onde a mandioca é um importante componente alimentar, é necessário que os carotenoides presentes nas raízes consumidas sejam absorvidos e eficientemente transformados em vitamina A.

A estabilidade dos carotenoides nas raízes de mandioca submetidas ao processo de cozimento, principal finalidade destes genótipos, foi considerada através dos valores de conteúdo de carotenoides persistentes na biomassa após o tratamento térmico (Tabela 5). Foi verificada uma grande amplitude de valores na estabilidade destes metabólitos secundários nas raízes de mandioca estudadas através dos dados de retenção. Os valores apresentaram uma média de 59,6% de retenção e variaram de 22,8% a 85,4%. Amplitudes semelhantes também foram observadas por outros autores (CEBALLOS *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2012).

Tabela 5 - Concentração de carotenoides totais e valores de retenção daqueles pigmentos (médias $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco \pm desvio padrão, $n= 3$ repetições) em amostras de raízes frescas e cozidas (água destilada em ebulição ($\sim 98^\circ\text{C}$) durante 30 minutos) de genótipos de *M. esculenta*.

Genótipos	Cor da polpa	Carotenoides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		Retenção (%)
		Raízes frescas	Raízes cozidas	
Apronta mesa	Branca	03.54 ± 0.52	02.18 ± 1.44	61.63
Pioneira	Amarela	13.24 ± 1.84	11.31 ± 1.34	85.45
Oriental	Branca	01.74 ± 0.69	01.25 ± 0.90	71.85
Amarela	Amarela	19.56 ± 1.04	08.62 ± 3.75	44.08
Catarina	Amarela	18.86 ± 1.58	15.25 ± 2.17	80.82
IAC 576-70	Amarela	20.68 ± 2.10	11.75 ± 3.24	56.81
Salézio	Branca	02.04 ± 0.72	00.59 ± 0.86	29.30
Estação	Branca	05.02 ± 1.27	03.54 ± 2.25	70.59
Videira	Branca	01.38 ± 0.75	01.04 ± 0.65	72.93
Rosada	Rosada	169.88 ± 17.96	38.86 ± 6.05	22.88

Ceballos *et al.*, (2012) analisaram a retenção de carotenoides em raízes de seis clones de mandioca submetidas ao cozimento em água em ebulição. As médias de retenções foram em torno de 86,6% e variaram de 76 a 96,7%. Resultados anteriores obtidos por Chávez *et al.*, (2007), também com raízes submetidas ao processo de fervura por 30 minutos, apresentaram 55,7% de retenção, com amplitude de variação de 27,2% a 82,8%. Em outro trabalho, Carvalho *et al.* (2005), avaliando um clone com elevado teor de β -caroteno e submetido ao processamento, tipicamente brasileiro de fabricação de farinha, verificaram que 60% do β -caroteno presentes nas raízes permaneceram na farinha ao final do processamento da biomassa.

Os trabalhos que examinam a relação entre o conteúdo de carotenoides em raízes frescas de *M. esculenta* e seus valores de retenção após o cozimento apresentam resultados muito discrepantes na literatura. Ceballos *et al.*, (2012) detectaram relação positiva entre o conteúdo de carotenoides totais em raízes frescas e seus valores de retenção após o cozimento, embora tenham apresentado uma fraca tendência entre estas duas variáveis, com coeficiente de regressão relativamente baixo ($0,536$, $r^2 = 0,243$). Estes resultados são contraditórios aos resultados apresentados por Chávez *et al.*, (2007) onde uma tendência em que raízes com altas concentrações de β -

caroteno apresentem maiores perdas durante o processamento foi detectada ($r^2 = 0,442$).

Neste trabalho foi constatada uma relação negativa entre o conteúdo de carotenoides e os valores de retenção ($R^2 = 0,350$) (

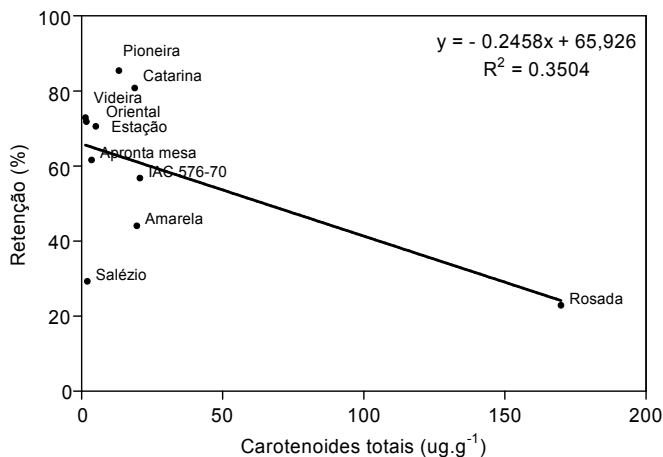


Figura 23) devido principalmente à grande influência do genótipo Rosada, que apresenta, expressivamente as maiores concentrações de carotenoides nas raízes e os menores valores de retenção. Contudo, genótipos como Pioneira e Catarina, de raízes com coloração amarela, com consideráveis conteúdos de carotenoides (Tabela 5), apresentaram altos valores de retenção. Por conseguinte, a plotagem de valores de retenção *versus* o conteúdo de carotenoides nas raízes frescas, excetuando os valores correspondentes ao genótipo Rosada, não constata relação negativa entre essas variáveis, ao contrário, sugere uma frágil relação positiva ($R^2 = 0,003$) (Figura suplementar 7).

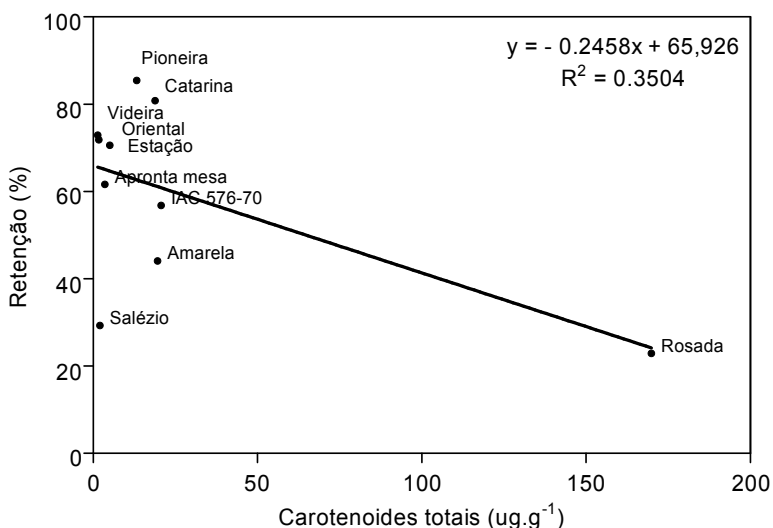


Figura 23 – Relação entre o conteúdo de carotenoides totais (µg.g⁻¹) para as dez amostras de raízes frescas de *M. esculenta* e retenção de carotenoides (%) após o processamento das raízes.

Estes resultados permitem inferir que os valores de retenção são independentes do conteúdo de carotenoides presentes nas raízes frescas e que extensas variações na retenção de carotenoides em *M. esculenta* após o cozimento, mesmo entre genótipos da mesma espécie, podem estar associadas às peculiaridades genéticas dos materiais amostrais. Segundo Chávez *et al.*, (2007), uma possível explicação à grande variação na retenção após o cozimento, em diferentes clones, pode ser devido às diferenças na susceptibilidade à oxidação enzimática durante o processamento. Caso esta hipótese seja comprovada, programas de melhoramento genético devem considerar, além de genótipos com altos teores de carotenoides, genótipos com maiores valores de retenção, i.e. de reduzida oxidação enzimática no cozimento.

A análise cromatográfica identificou os isômeros de posição *cis*-β- e *trans*-β- caroteno, α-caroteno, luteína e β-criptoxantina em todos os genótipos analisados, sendo confirmada a presença de licopeno somente no genótipo Rosada. *Trans*-β-caroteno foi o componente majoritário em todas as amostras analisadas (Figura 24).

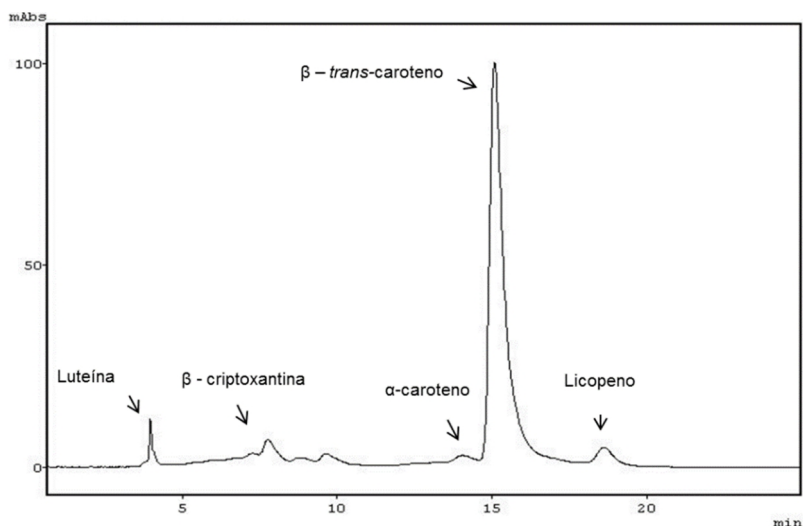


Figura 24 Perfil cromatográfico (CLAE, 450 nm) típico de carotenoides de raízes do genótipo de mandioca de mesa “Rosada”, claramente revelando ser o *trans*-β-caroteno o componente majoritário.

Os valores das análises quantitativas dos compostos carotenóidicos por CLAE estão apresentados na Tabela 6. As maiores concentrações destes metabólitos são observadas em genótipos com raízes de polpa pigmentada (amarela e rosada).

Os compostos carotenóidicos majoritários (*cis*-β e *trans*-β-caroteno) apresentaram valores de amplitudes de concentrações de 0,09 a 166,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (*trans*-β-caroteno) e 0,04 a 5,83 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (*cis*-β-caroteno). Somente o genótipo Rosada exibiu maiores concentrações de α-caroteno ($4,73 \pm 1,21 \mu\text{g.g}^{-1}$) e β-criptoxantina ($0,60 \pm 0,26 \mu\text{g.g}^{-1}$). α-caroteno e β-criptoxantina, assim como, luteína foram detectados em baixas concentrações nos demais genótipos.

Os teores dos isômeros de β-caroteno (*cis* + *trans*) para os genótipos com raízes de coloração amarela variaram de 6,39 (Pioneira) a 12,25 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (IAC 576-70). Valores semelhantes também foram encontrados na literatura para genótipos com a mesma coloração na polpa da raiz 7,6 a 13,50 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (CHAVÉZ *et al.*, 2007), 6,2 a 7,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (TAKKAR *et al.*, 2009).

O genótipo Rosada apresentou uma concentração de $1,53 \pm 0,56 \mu\text{g.g}^{-1}$ de licopeno. Valores superiores ($8,86 \mu\text{g.g}^{-1}$) deste composto foram encontrados por Fukuda & Pereira (2006) para este mesmo genótipo, no município de Cruz das Almas, Bahia. Estas diferenças quantitativas devem-se provavelmente, às diferenças nas metodologias de extração e identificação, além dos fatores abióticos e bióticos e. g. diferenças edafoclimáticas, época de colheita, etc., que podem influenciar na bioacumulação destes compostos nas raízes.

Tabela 6 – Concentração média* ($\mu\text{g/g} \pm$ desvio padrão) de carotenoides totais e luteína, β -criptoxantina, α -caroteno, *cis*- β -caroteno, *trans*- β -caroteno e licopeno*** em amostras de raízes de genótipos de mandioca determinados por CLAE.**

Genótipos	Total** ²	Luteína	β -criptoxantina	α -caroteno	<i>cis</i> - β -caroteno	<i>trans</i> - β -caroteno	Licopeno
Apronta mesa	03,54 \pm 0,52	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,11 \pm 0,02	0,09 \pm 0,1	<i>n.d.</i>
Pioneira	13,24 \pm 1,84	0,32 \pm 0,08	0,07 \pm 0,02	0,31 \pm 0,11	2,97 \pm 0,43	3,42 \pm 0,43	<i>n.d.</i>
Oriental	01,74 \pm 0,69	0,05 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	<i>n.d.</i>	0,11 \pm 0,05	0,12 \pm 0,12	<i>n.d.</i>
Amarela	19,56 \pm 1,04	0,69 \pm 0,32	0,03 \pm 0,02	0,04 \pm 0,02	3,29 \pm 0,52	4,22 \pm 1,73	<i>n.d.</i>
Catarina	18,86 \pm 1,58	0,36 \pm 0,07	0,08 \pm 0,02	0,20 \pm 0,09	4,77 \pm 0,70	5,80 \pm 0,71	<i>n.d.</i>
IAC 576-70	20,68 \pm 2,10	0,69 \pm 0,34	0,08 \pm 0,01	0,66 \pm 0,31	5,83 \pm 1,11	6,42 \pm 1,47	<i>n.d.</i>
Salézio	02,04 \pm 0,72	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	<i>n.d.</i>	0,07 \pm 0,19	0,35 \pm 0,07	<i>n.d.</i>
Estação	05,02 \pm 1,27	0,06 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	<i>n.d.</i>	0,25 \pm 0,12	0,33 \pm 0,16	<i>n.d.</i>
Crioulo de Videira	01,38 \pm 0,75	0,07 \pm 0,06	0,11 \pm 0,14	<i>n.d.</i>	0,04 \pm 0,01	0,34 \pm 0,39	<i>n.d.</i>
Rosada	169,88 \pm 17,96	0,51 \pm 0,25	0,60 \pm 0,26	4,73 \pm 1,21	4,48 \pm 1,24	166,30 \pm 30,29	1,53 \pm 0,56

* Média de três extrações \pm SD (desvio padrão da média);

** Determinado por espectrofotometria UV-visível (450nm) e ϵ de 2590 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

*** Determinado por CLAE (450nm) e conteúdo de carotenoides calculados através da intensidade do pico de interesse;

n.d. - Não detectado

² A quantificação de carotenoides totais medida por CLAE apresentou valores ligeiramente inferiores à quantificação espectrofotométrica (**Figura suplementar 1**). Esta diferença é comumente explicada pelo fato de que o método espectrofotométrico inclui todos os carotenoides presentes na amostra, enquanto que a quantificação por CLAE é resultado do somatório dos teores de algumas classes de pigmentos especificamente identificados (CHÁVEZ *et al.*, 2007; LUTEROTTI *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrado ainda, que o processamento de mandioca incrementa significativamente o conteúdo dos isômeros *cis*- β -caroteno (THAKKAR *et al.*, 2009; HOWE *et al.*, 2009; CEBALLOS *et al.*, 2012). Ceballos *et al.* (2012) verificaram que a média da concentração de 13-*cis*- β -caroteno aumentou de 1,8 para 4,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ após o cozimento das raízes. Thakkar *et al.*, (2009) observaram que all-*trans*- β -caroteno foi responsável por 69% e 63% de β -caroteno total após o cozimento das amostras por 5 e 20 minutos, respectivamente. Esta perda de all-*trans*- β -caroteno foi associada ao aumento concomitante em 13-*cis*- β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno. A porcentagem de isômeros *cis* após o processamento foi acrescida de 30 para 52% em raízes de 10 genótipos de mandioca processados. É sugerido por estes autores, portanto, que ocorra um efeito de isomerização de *trans*- β -caroteno para *cis*- β -caroteno durante o processamento das raízes para o consumo. Embora a atividade equivalente de retinol (RAE) para os isômeros *trans* seja duas vezes maior do que para os isômeros *cis*, esta informação deve ser considerada.

Para os genótipos analisados neste trabalho e com as condições cromatográficas empregadas neste estudo, não foi possível verificar o efeito de isomerização de carotenoides após o cozimento. De fato, houve perdas, tanto nos conteúdos de *trans*- β -caroteno como *cis*- β -caroteno após o processo de cozimento das raízes utilizado (Tabela 7), apresentando, inclusive, valores médios de retenção semelhantes para estes compostos, i.e., 43,12% e 44,84%, respectivamente.

Os conteúdos dos demais pigmentos carotenóidicos identificados por CLAE após o processo de cozimento das raízes de mandioca estão apresentados na Tabela suplementar 2.

Tabela 7 - Concentração de carotenoides (médias $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm$ desvio padrão, n= 3 repetições) em amostras de raízes de genótipos de *M. esculenta* frescas e submetidas ao processo de cozimento (água destilada em ebulição, $\sim 98^\circ\text{C}$, durante 30 minutos). *n.d.* – não detectado.

Genótipos	β - <i>trans</i> -caroteno		β - <i>cis</i> -caroteno	
	Massa fresca	Massa cozida	Massa fresca	Massa cozida
Apronta mesa	$0,09 \pm 0,1$	<i>n.d.</i>	$0,11 \pm 0,02$	<i>n.d.</i>
Pioneira	$3,42 \pm 0,43$	$2,26 \pm 0,09$	$2,97 \pm 0,43$	$1,63 \pm 0,23$
Oriental	$0,12 \pm 0,12$	$0,07 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,05$	<i>n.d.</i>
Amarela	$4,22 \pm 1,73$	$2,98 \pm 0,90$	$3,29 \pm 0,52$	$2,41 \pm 1,02$
Catarina	$5,80 \pm 0,71$	$4,26 \pm 1,13$	$4,77 \pm 0,70$	$3,18 \pm 0,76$
IAC 576-70	$6,42 \pm 1,47$	$2,35 \pm 0,18$	$5,83 \pm 1,11$	$1,73 \pm 0,07$
Salézio	$0,35 \pm 0,07$	$0,04 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,19$	$0,01 \pm 0,03$
Estação	$0,33 \pm 0,16$	$0,11 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,12$	$0,02 \pm 0,03$
Videira	$0,34 \pm 0,39$	$0,09 \pm 0,15$	$0,04 \pm 0,01$	<i>n.d.</i>
Rosada	$166,30 \pm 30,29$	$12,7 \pm 1,15$	$4,48 \pm 1,24$	$1,78 \pm 0,07$

O estudo quimiométrico realizado com os dados gerados pela cromatografia líquida de alta eficiência empregando a análise dos componentes principais (PCA) permitiu detectar padrões de similaridade da composição carotenoidica entre os genótipos avaliados, representados pela localização próxima dos autovalores. Os autovetores podem ser considerados como uma medida da relativa importância de cada variável em relação às componentes principais e os respectivos sinais e, se positivos, ou negativos, indicam relações direta ou inversamente proporcionais. Tal método reduz o número de dimensões que definem a variação dos dados, simplificando a interpretação dos resultados, sem perder, no entanto, a fração mais relevante das informações associadas a estes. A Figura 25 mostra os agrupamentos resultantes após o cálculo dos componentes principais, obtidos a partir da dosagem dos pigmentos carotenoidicos em amostras de raízes de 10 genótipos de *M. esculenta*. Em seu conjunto PC1 e PC2 explicam 92,5 % da variância total dos dados da população amostral em estudo.

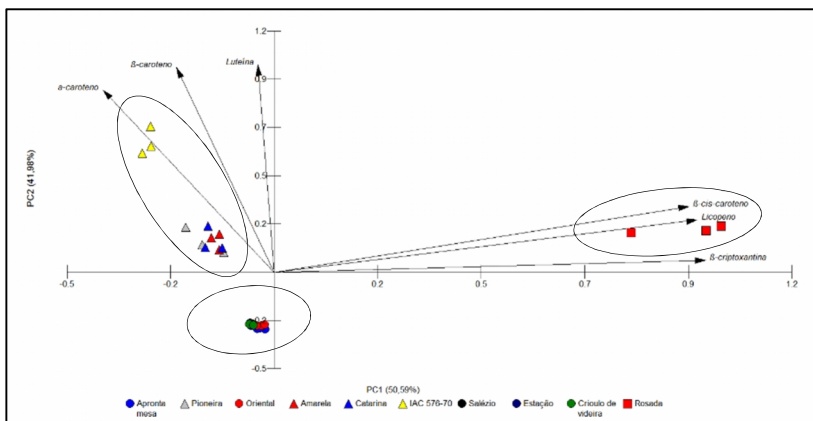


Figura 25 – Distribuição fatorial dos componentes principais 1 e 2 resultante dos dados do perfil carotenóidico quantitativo determinado por cromatografia líquida de alta eficiência, em raízes de 10 genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, n= 3 repetições). Os genótipos agrupados em PC1-/PC2+ (A), PC1-/PC2- (B) e PC1+/PC2+ (C) apresentam raízes de coloração amarela, branca e rosada, respectivamente.

A PCA elaborada revelou agrupamento de acordo com a coloração da polpa das raízes dos genótipos em questão. Os genótipos com raízes de coloração amarela (Pioneira, Amarela, Catarina e IAC-576-70) agruparam-se em PC2 positivo, influenciados pela maior concentração de *trans*-β-caroteno, α-caroteno e luteína. Inversamente, os genótipos com polpa de coloração branca (Apronta mesa, Oriental, Salézio, Estação e Crioulo de Videira) agruparam-se em PC1 e PC2 negativo, justamente por apresentarem concentrações inferiores daqueles pigmentos entre os genótipos. As amostras de raízes com polpa de coloração rosada apresentaram maior dissimilaridade entre os genótipos analisados e foram agrupadas em PC1 positivo, influenciadas diretamente pela presença de licopeno e concentrações maiores de *cis*-β-caroteno e β-criptoxantina.

Análises quimiométricas também foram realizadas com os resultados dos perfis espectrofotométricos de varredura UV-vis. (200-700 nm) (Figura 26). Todos os perfis espectrais das raízes com polpa de coloração amarela e rosada evidenciaram sinais de absorbância entre 410 e 470 nm, indicando que o sistema extrator acetona: éter de petróleo (v/v) foi capaz de extrair os carotenóides presentes nas raízes de

mandioca. Tal sistema de solventes também extraiu eficientemente compostos fenólicos, conforme indicado pelos valores de absorbância entre 290-380 nm (BACHEREAU *et al.*, 1998). Nas Figura suplementar 8 e 9 estão apresentados os perfis espectrais típicos dos genótipos com raízes de coloração amarela e branca, ressaltando-se a ausência de sinais de absorbâncias derivadas da presença de clorofilas.

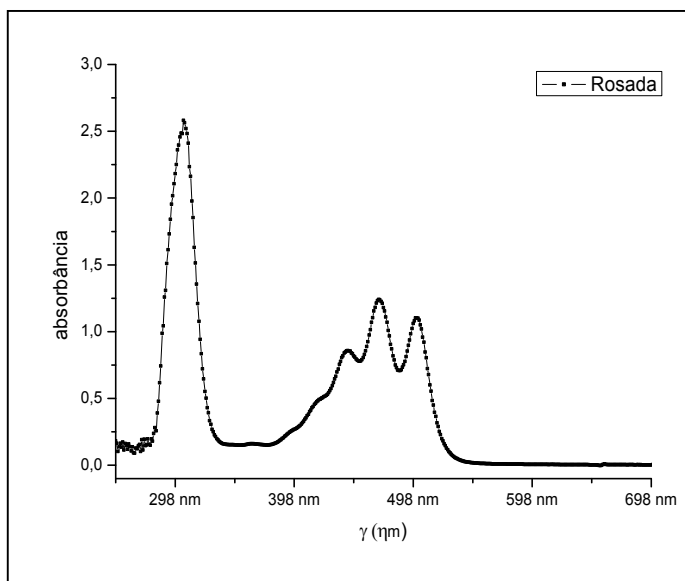


Figura 26 Perfil espectrofotométrico típico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato acetona: éter de petróleo, obtido a partir do tecido parenquimático de raízes do genótipo Rosada.

Os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 77,87% a variância presente nos dados (Figura 27). As análises destes componentes, por sua vez, não revelaram um claro agrupamento amostral em função dos teores de carotenoides nas amostras. Somente amostras do genótipo Rosada distinguiram-se das demais, agrupando-se em PC1+/PC2-. Já amostras de genótipos com raízes de coloração amarela (altos teores de carotenoides) e branca (baixos teores de carotenoides) apresentaram uma dispersão pelos demais quadrantes do gráfico de distribuição fatorial. Estes resultados mostraram-se influenciados pelos altos valores de *loadings* em PC2,

referentes aos comprimentos de ondas entre 300 e 400 nm (absorção característica da classe de compostos fenólicos).

Sendo os carotenoides considerados os metabólitos alvo na caracterização do extrato acetona: éter de petróleo, as informações geradas via cálculo dos componentes principais na janela espectral de 400 a 500 nm, típica da região de absorção de carotenoides, foram semelhantes ao observado com os dados de quantificação cromatográfica. Neste caso, PC1 e PC2 contribuíram para explicar 99,97% da variância dos dados da varredura espectrofotométrica. As amostras agruparam-se em função dos seus teores de carotenoides e distribuíram-se em função da coloração da polpa da raiz. Genótipos com coloração amarela agruparam-se ao longo do eixo de PC2 -, aqueles com teores inferiores de carotenoides agruparam-se em PC2+ e amostras do genótipo Rosada distinguiram-se das demais agrupando-se em PC1+ (Figura 28).

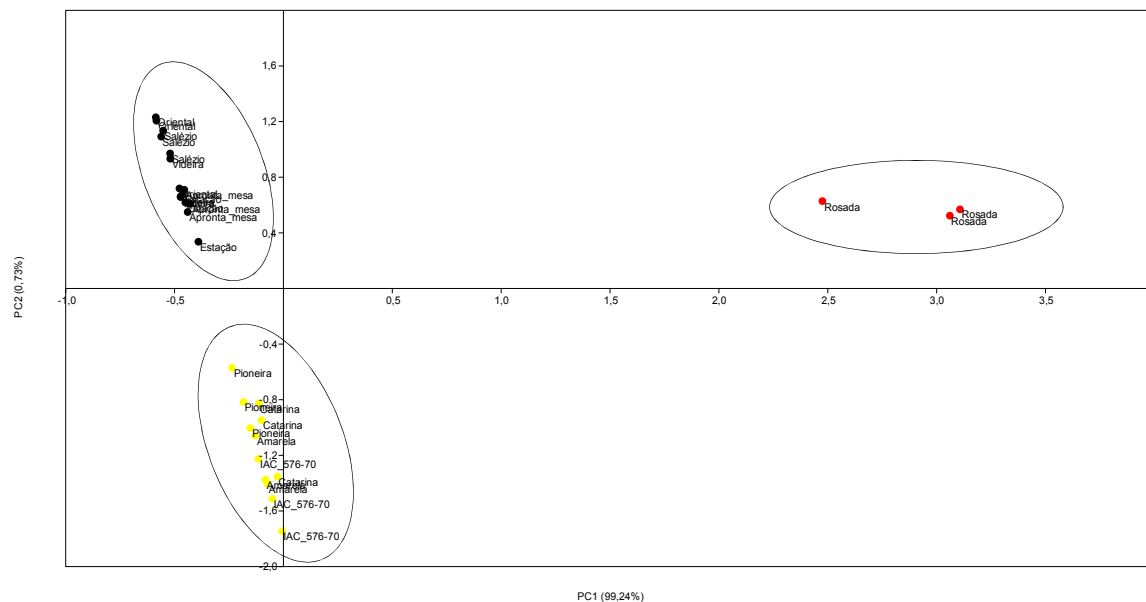


Figura 28- Distribuição fatorial dos componentes principais 1 e 2 resultante dos dados do perfil espectrofotométrico UV visível (400-500 nm) – região de absorção típica para carotenoides, em raízes de 10 genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, n = 3 repetições). Os genótipos agrupados em PC1-/PC2+, PC2- e PC1+/PC2+, apresentam raízes de coloração branca, amarela, e rosada, respectivamente.

A análise de *clustering* realizada com os dados da varredura 400-500 nm está apresentada na Figura 29. A correlação cofenética foi de 92,41%. As similaridades definidas com base na distância (distância euclidiana) entre duas amostras usando média aritmética (UPGMA) revelaram os mesmos agrupamentos formados pela matriz de correlação composta pela PCA com os dados de varredura UV vis. (400-500nm) e quantificação cromatográfica. Nesta análise, porém, podem-se verificar a significância estatística entre os genótipos de maior similaridade de composição carotenoidica dentro de cada grupo formado.

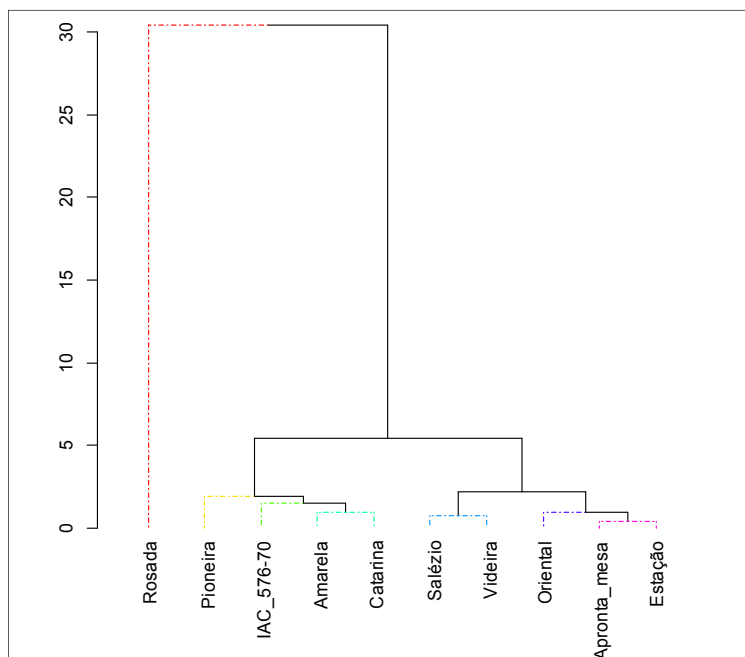


Figura 29 – Análise hierárquica (UPGMA) a partir dos dados da varredura espectrofotométrica UV-vis. (400-500 nm) do extrato organosolvente de raízes dos dez genótipos estudados. A similaridade entre genótipos membros de um mesmo *cluster* é significativa estatisticamente quando as ramificações no dendrograma apresentam a mesma coloração³.

³ Significância determinada através da análise *Simprof* (*Similarity Profile Analysis*) do pacote *Clustsig* do R, de acordo com Clarke, Somerfield & Gorley, (2008).

Uma análise hierárquica desenvolvida através dos dados da quantificação cromatográfica também foi realizada e os resultados apresentaram-se similares aos dados da varredura UV- vis para a janela espectral de compostos carotenoidicos (Figura suplementar 10).

Para que um programa de melhoramento de seleção de genótipos biofortificados de mandioca logre êxito é necessário que as características dos genótipos, e.g., tipos e conteúdos de carotenoides que poderão ser utilizados como genitores sejam conhecidas (MEZETTE, 2007). As informações geradas pela relação entre os autovalores e autovetores derivados da análise dos componentes principais podem ser empregadas na busca de genótipos com teores superiores de metabólitos-alvo, em programas de melhoramento genético. A abordagem analítica utilizada, acoplando CLAE e espectrofotometria UV-visível à análise quimiométrica apresenta-se, portanto, como um instrumento eficiente para classificar a variabilidade e auxiliar na seleção de genótipos de interesse.

Uma vez que os perfis espectrais detectaram a presença de metabólitos que absorvem luz na região entre 290 e 360 nm, indicando a presença de derivados dos ácidos fenólicos, foi determinado o perfil de composição destes compostos.

Os valores de conteúdo médio de fenólicos totais em raízes frescas, determinados por espectrofotometria UV-visível estão apresentados na Tabela 8. Os conteúdos variaram de $32,59 \pm 6,34 \mu\text{g.g}^{-1}$ (IAC 576-70) a $128,32 \pm 18,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Rosada). Os genótipos Rosada e Apronta mesa apresentaram os maiores teores, diferindo estatisticamente dos demais genótipos, quanto à variável em estudo. Eleazu *et al.*, (2011) observaram amplitudes semelhantes ao analisar dez genótipos de mandioca comumente cultivados na Nigéria. Os autores detectaram uma amplitude de concentrações daqueles metabólitos secundários de 46,00 a $174 \mu\text{g.g}^{-1}$. Valores superiores de fenólicos totais são observados na literatura científica para batata (*Solanum tuberosum*), e.g., 690 a $990 \mu\text{g.g}^{-1}$ em batatas com polpa de coloração amarela cultivadas em Filipinas (Rumbaoa *et al.*, 2009), Porém, devido à importância da cultura da mandioca como alimento típico, principalmente em regiões onde prevalece a desnutrição e doenças relacionadas, a identificação destes metabólitos é relevante.

Tabela 8 – Concentração média* ($\mu\text{g/g} \pm$ desvio padrão) de fenólicos totais, ácido gálico, quercetina, epigallocatequina, ácido clorogênico, ácido *p*-hidróxibenzóico e epicatequina galato*** em amostras de raízes de genótipos de mandioca determinados por CLAE.**

Genótipos	Total**	Ácido gálico	Quercetina	Epigallocatequina	Ácido clorogênico	Ácido <i>p</i> -hidróxibenzóico	Epicatequina galato
Apronta mesa	79,25 \pm 2,71 ^b	13,48 \pm 2,36	2,97 \pm 0,98	29,65 \pm 1,36	2,98 \pm 0,65	5,42 \pm 1,36	0,29 \pm 0,08
Pioneira	33,29 \pm 1,89 ^c	11,68 \pm 6,06	3,28 \pm 4,53	59,36 \pm 1,27	2,96 \pm 5,13	3,32 \pm 1,75	<i>n.d.</i>
Oriental	42,32 \pm 2,98 ^c	10,44 \pm 0,59	1,81 \pm 1,57	41,59 \pm 9,13	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,11 \pm 0,10
Amarela	47,79 \pm 9,79 ^c	15,44 \pm 1,22	2,78 \pm 0,64	66,01 \pm 6,47	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,29 \pm 0,08
Catarina	53,73 \pm 8,16 ^c	11,75 \pm 1,21	0,59 \pm 0,05	<i>n.d.</i>	1,94 \pm 0,64	<i>n.d.</i>	0,04 \pm 0,06
IAC 576-70	32,59 \pm 6,34 ^c	8,65 \pm 0,63	<i>n.d.</i>	28,34 \pm 3,64	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,12 \pm 0,01
Salézio	52,79 \pm 5,62 ^c	9,34 \pm 1,03	<i>n.d.</i>	47,62 \pm 1,09	3,61 \pm 1,27	1,90 \pm 1,30	0,29 \pm 0,02
Estação	37,19 \pm 6,22 ^c	11,00 \pm 3,21	1,28 \pm 1,44	43,63 \pm 5,08	0,20 \pm 0,35	<i>n.d.</i>	0,17 \pm 0,04
Videira	38,96 \pm 4,00 ^c	17,44 \pm 10,80	0,53 \pm 0,46	10,87 \pm 9,43	2,83 \pm 3,51	6,87 \pm 4,6	0,13 \pm 0,1
Rosada	128,32 \pm 18,20 ^a	69,68 \pm 12,96	30,15 \pm 5,00	230,74 \pm 97,14	47,00 \pm 5,27	32,16 \pm 26,71	9,73 \pm 1,11

* Média de três extrações \pm SD (desvio padrão da média);

** Determinado por espectrofotometria UV-visível (765 nm) e curva de calibração com ácido gálico ($r^2 = 0,99$)

*** Determinado por CLAE (280 nm) e conteúdo de compostos fenólicos calculados através da intensidade dos picos de interesse

n.d. – não detectado

Subsequente à análise espectrofotométrica foi realizada a caracterização dos compostos fenólicos por CLAE. A análise cromatográfica identificou os metabólitos: ácido gálico, quercetina, epigallocatequina, ácido clorogênico, ácido *p*-hidróxibenzóico e epicatequina galato. O genótipo Rosada apresentou as maiores concentrações daqueles metabólitos secundários e seu perfil cromatográfico derivado do extrato metanólico da biomassa radicular é mostrado na Figura 30.

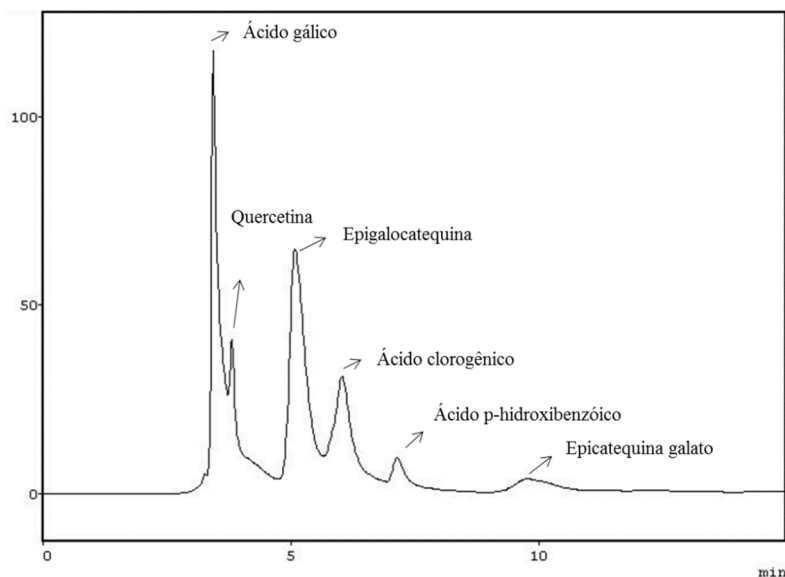


Figura 30 - Perfil cromatográfico (CLAE, 280 nm) de compostos fenólicos de raízes do genótipo de mandioca de mesa “Rosada”.

Muitos estudos tem conclusivamente revelado que a atividade antioxidante nas plantas seja atribuída a presença de compostos fenólicos e flavonoides (YI *et al.*, 2010).

Aprofundando as informações associadas aos efeitos benéficos do extrato metanólico das raízes de mandioca, a atividade antioxidante destes foi determinada através do ensaio de sequestro do radical livre DPPH (1, 1-difenil-2 picrilhidrazil), conforme metodologia adaptada de Kim *et al.*, (2002). Os resultados obtidos indicaram uma inibição de aproximadamente 4,7% da oxidação do radical DPPH, após 30 minutos.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os genótipos de mandioca quanto a esta variável em estudo, contudo, o genótipo Rosada, que apresentou os maiores teores de carotenoides e compostos fenólicos, apresentou o maior valor de oxidação do radical DPPH (10,9% de inibição). As porcentagens de inibição da oxidação do radical DPPH obtidas para os extratos metanólicos das raízes de mandioca estudadas estão apresentadas na Figura 31.

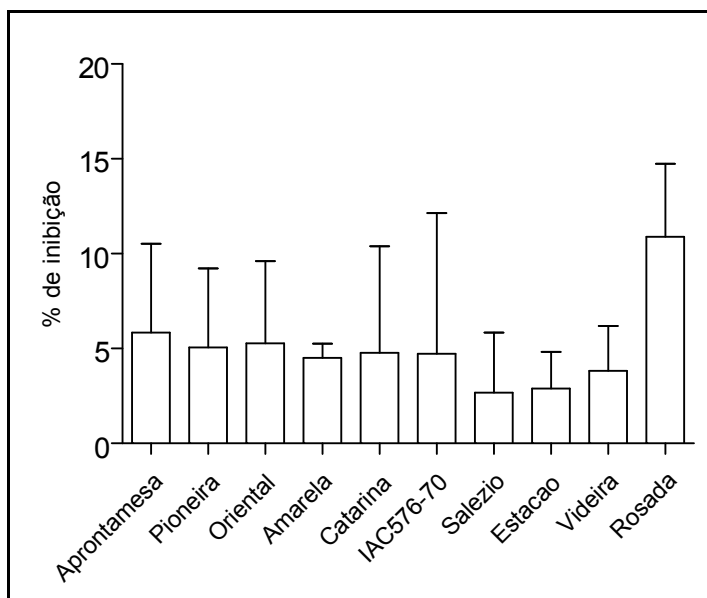


Figura 31- Porcentagem de inibição da oxidação do radical DPPH (1, 1-difenil-2 picrilhidrazil) obtida para o extrato metanólico das raízes de mandioca estudadas.

Yi *et al.*, (2010) atribuíram a atividade antioxidante em raízes de mandioca à presença de compostos fenólicos e flavonoides nas raízes.

Neste trabalho, foi observada correlação positiva entre os conteúdos de compostos fenólicos totais ($r = 0,788$, $p < 0,05$) calculados por espectrofotometria UV-vis e os valores de oxidação do radical DPPH, conferindo atividade antioxidante destes metabólitos nas raízes dos genótipos estudados.

4 CONCLUSÕES

A ampla disparidade no conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos observada revela a variabilidade química dos genótipos analisados.

Genótipos do banco de germoplasma da Epagri e cultivados por agricultores familiares no estado de Santa Catarina exibiram quantidades apreciáveis de carotenoides, indicando seu potencial como fonte de compostos de interesse à saúde humana e nutrição, dada à presença de carotenóides provitamina A (β -caroteno, e.g.) e licopeno nas raízes de coloração amarela e rosada, respectivamente.

O genótipo Rosada destacou-se dos demais por sua riqueza na composição carotenóidica e fenólica, apresentando valores superiores destes metabólitos e por apresentar consideráveis teores de licopeno nas raízes.

Foi verificada uma grande amplitude na estabilidade de carotenoides nas raízes de mandioca submetidas ao processo de cozimento, através dos dados de retenção.

Não foi possível verificar o efeito de isomerização de carotenoides após o cozimento, ainda que perdas nos conteúdos de *trans*- β -caroteno como *cis*- β -caroteno após o processo de cozimento das raízes tenham sido detectadas.

Foi observada correlação positiva entre os conteúdos de compostos fenólicos totais e os valores de oxidação do radical DPPH, conferindo a estes metabólitos a atividade antioxidante nas raízes dos genótipos de mandioca estudadas.

O conjunto de dados obtidos pelas técnicas analíticas empregadas i.e. espectrofotometria UV-visível e cromatografia líquida de alta eficiência, associadas à quimiometria (PCA e *clusters*), permitiu um melhor entendimento da variabilidade química associada à composição carotenóidica das raízes dos genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estudados. Assume-se, portanto, que o uso concomitante destas tecnologias analíticas seja uma ferramenta eficiente na busca e definição de genótipos com teores superiores de metabólitos-alvo, de importância em programas de melhoramento genético assistido, subsidiando a seleção de genótipos parentais promissores e/ou potenciais, além dos caracteres agrônômicos comumente avaliados.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro. Edital 22/2010 – CNPq/Repena. (*Desenvolvimento da Cadeia Produtiva da Mandioca na Região Centro-Sul do Brasil*).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACHEREAU, F.; MARIGO, G.; ASTA, J. Effects of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. **Physiologia Plantarum**, v. 104: p. 203-210, 1998.

CARVALHO, P.R.N.; VALLE, T.L.; CARVALHO, C.R.L.; SILVA, M.G.; PARRA, E.B.; FELTRAN, J.C; GALERA, J.M.S. Degradação de β -caroteno durante a produção artesanal de farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: Anais do XI Congresso Brasileiro de Mandioca, Campo Grande, CD-ROM, 2005.

CARVALHO, M.J.; ALCIDES, R.G.; RONOEL, L.O.; PACHECO, S.; NUTTI, R.M.; CARVALHO, J.V.; FUKUDA, W.G. Retention of total carotenoid and β -carotene in yellow sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz) after domestic cooking. **Food & Nutrition Research**, v. 56, p. 157-188, 2012.

CEBALLOS, H.; LUNA, J.; ESCOBAR, A.F.; ORTIZ, D.; PÉREZ, J.C.; SÁNCHEZ, T.; PACHÓN, H.; DUFOUR, D. Spatial distribution of dry matter in yellow fleshed cassava roots and its influence on carotenoid retention upon boiling. **Food Research International**, v. 45, p. 52–59, 2012.

CHAMPAGNE, A., BERNILLON, S., MOING, A., ROLIN, D., LEGENDRE, L., LEBOT, V. Carotenoid profiling of tropical root crop chemotypes from Vanuatu, South Pacific. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 763–771, 2010.

CHAVÉZ, A.L; SÁNCHEZ, T.; CEBALLOS, H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; NESTEL, P.; TOHME, J.; ISHITANI, M. Retention of carotenoids in cassava roots submitted to different processing methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 388–393, 2007.

CHAVÉZ, A.L.; SÁNCHEZ, T.; JARAMILLO, G. J.M.; ECHEVERRY, J.; BOLANOS, E.A. Variation of quality traits in cassava roots evaluated in landraces and improved clones. **Euphytica**, v. 143, p. 125–133, 2005.

CLARKE, K.R., SOMERFIELD, P.J., AND GORLEY, R.N. Testing of null hypotheses in exploratory community analyses similarity profiles and biota-environment linkage. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 366, p. 56-69, 2008

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W., (ed.). **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. 2. ed. London: Academic Press, cap. 19, v. 2, p. 38-165, 1976.

ELEAZU, C. O., AMAJOR, J. U., IKPEAMA, A.I., AWA, E. Studies on the nutrient composition, antioxidant activities, functional properties and microbial load of the flours of 10 elite cassava (*Manihot esculenta*) varieties, **Asian Journal of Clinical Nutrition**, v. 3, p. 33-39, 2011.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Rome, Italy. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/>. Acesso em: 13/04/2012.

FAO/WHO. Human vitamin and mineral requirements. Chapter 7, Vitamin A. 2002. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/004/y2809e/y2809e00>. Acesso em: 14/04/2012.

FUKUDA W.M.G.; PEREIRA, M. E. C. BRS Rosada – Mandioca de mesa com raiz colorida e mais nutritiva. Folder BRS Rosada - Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, Bahia, 2006.

HOWE, J.A.; MAZIYA-DIXON, B.; TANUMIHARDJO, S.A.. Cassava with enhanced β -carotene maintains adequate vitamin A status in

Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) despite substantial cis-isomer content. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 342-349, 2009.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

IGLESIAS, C.; MAYER, J.; CHAVEZ, L.; CALLE, F. Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. **Euphytica**, v. 94, p. 367–373, 1997.

KIM, Y. K., GUO, Q., PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149–156, 2002.

LUTEROTTI, S.; MARKOVIC, K.; FRANKO, M.; BICANIC, D.; MADZGALJ, A.; KLJAK, K. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. **Food Chemistry**, v. 140, p. 390-397, 2013.

MAZIYA-DIXON, B., KLING, J.G., MENKIR, A., DIXON, A. Genetic variation in total carotene, iron, and zinc contents of maize and cassava genotypes. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 21, p. 419–422, 2000.

MEZETTE, T. F. Seleção de variedades de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) com altos teores de carotenóides e vitamina A. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia), IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), São Paulo, 2007.

MONTAGNAC, J.A.; DAVIS, C.R.; TANUMIHARDJO, S.A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p 181–194, 2009.

Prefeitura Municipal de Urussanga – SC, disponível em: <http://www.urussanga.sc.gov.br>. Acesso em 29/05/13.

RODRIGUES-AMAYA, D. B. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. – Brasília: MMA, 100 p. 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2. HarvestPlus, Washington, DC, e Cali, International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2004.

ROGINSKY, V., LISSI, E.A., Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235–254, 2005.

RUMBAOA, R. G. O., CORNAGO, D. F., GERONIMO, I. M. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 546–550, 2009.

SÁNCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J. A., SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal Science. Food Agriculture**. v. 76, p. 270–276, 1998.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 345–351, 2003.

THAKKAR, S. K.; HUO, T.; MAZIYA-DIXON, B.; FAILLA, M. L.. Impact of style of processing on retention and bioaccessibility of β -carotene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1344–1348, 2009.

YI, B., HU, L., MEI, W., ZHOU, K., WANG, H., LUO, Y., WEI, X., DAI, H. Antioxidant phenolic compounds of cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. **Molecules**, v. 16, p. 10157-10167, 2010.

WHO. (World Health Organization Global) Prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global Database on Vitamin A deficiency. Geneva, 2012.

APÊNDICES

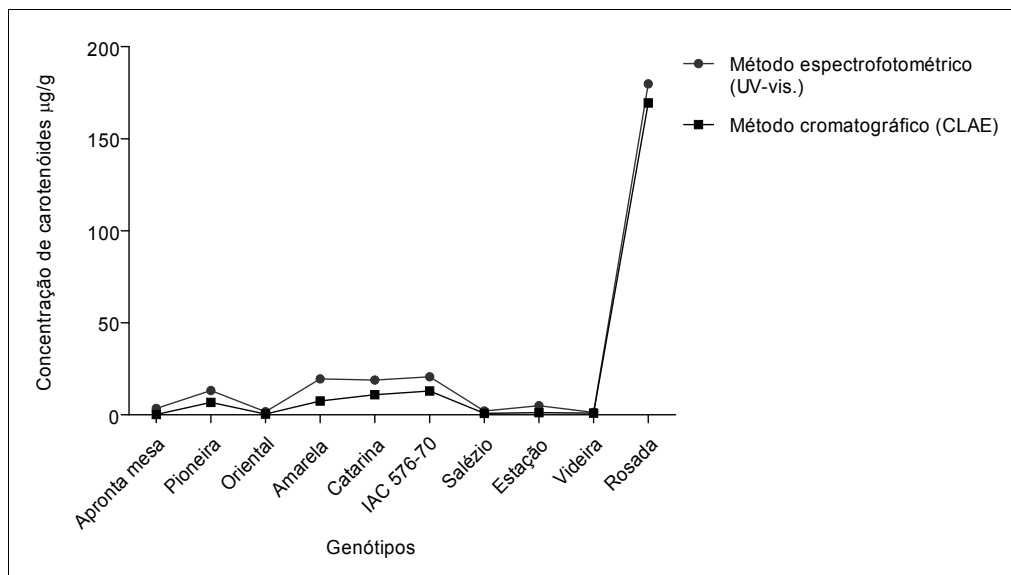


Figura suplementar 6 - Teores de carotenoides totais calculados para os genótipos de *M. esculenta* através de técnicas espectrofotométrica (UV-visível, 450nm, $\epsilon = 2590 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e cromatográfica (CLAE, 450nm).

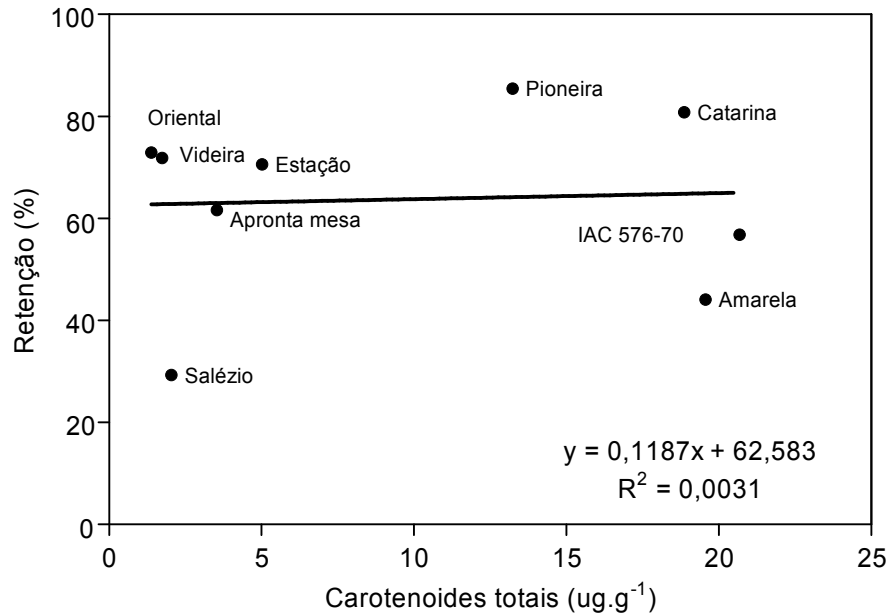


Figura suplementar 7 - Relação entre o conteúdo de carotenoides totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras de raízes frescas de *M. esculenta* estudadas, excluído o genótipo Rosada, e retenção de carotenoides (%) após o processamento das raízes.

Tabela suplementar 2 - Concentração (médias $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm$ desvio padrão, n= 3 repetições) de luteína, β -criptoxantina, α -caroteno, *cis*- β -caroteno, *trans*- β -caroteno e licopeno em amostras de raízes de genótipos de *M. esculenta* submetidas ao processo de cozimento (água destilada em ebulição, $\sim 98^{\circ}\text{C}$, 30 minutos). *n.d.* – não detectado.

Genótipos	Luteína	β-criptoxantina	α-caroteno	β-<i>trans</i>-caroteno	β-<i>cis</i>-caroteno	Licopeno
Apronta mesa	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Pioneira	0.07 ± 0.06	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2.26 ± 0.09	1.63 ± 0.23	<i>n.d.</i>
Oriental	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.07 ± 0.05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Amarela	0.25 ± 0.2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2.98 ± 0.90	2.41 ± 1.02	<i>n.d.</i>
Catarina	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.0	<i>n.d.</i>	4.26 ± 1.13	3.18 ± 0.76	<i>n.d.</i>
IAC 576-70	0.08 ± 0.14	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2.35 ± 0.18	1.73 ± 0.07	<i>n.d.</i>
Salézio	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.04 ± 0.07	0.01 ± 0.03	<i>n.d.</i>
Estação	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.11 ± 0.09	0.02 ± 0.03	<i>n.d.</i>
Crioulo de Videira	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.09 ± 0.15	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Rosada	0.19 ± 0.23	0.23 ± 1.06	<i>n.d.</i>	12.7 ± 1.15	1.78 ± 0.07	1.71 ± 0.40

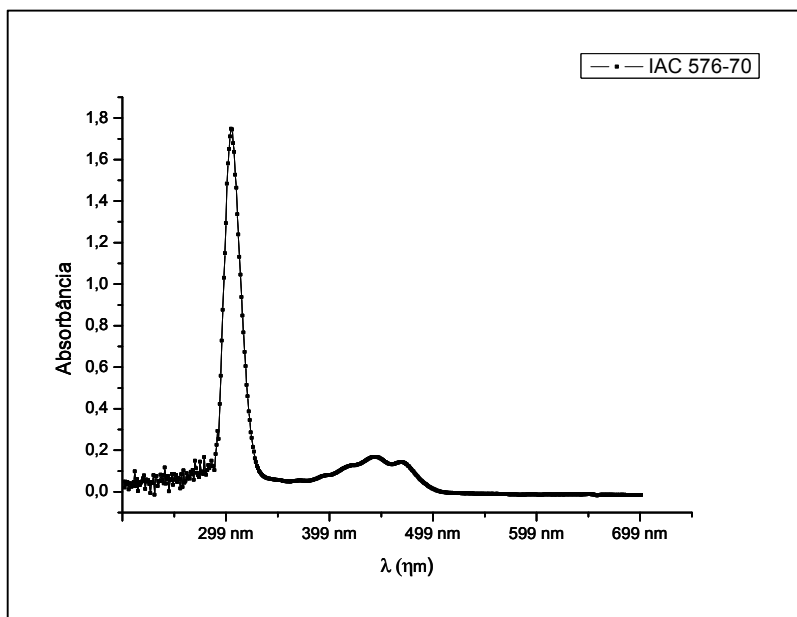


Figura suplementar 8 - Perfil espectrofotométrico típico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato acetona: éter de petróleo, obtido a partir do tecido parequimático de raízes do genótipo IAC 576-70 (Polpa da raiz com coloração amarela).

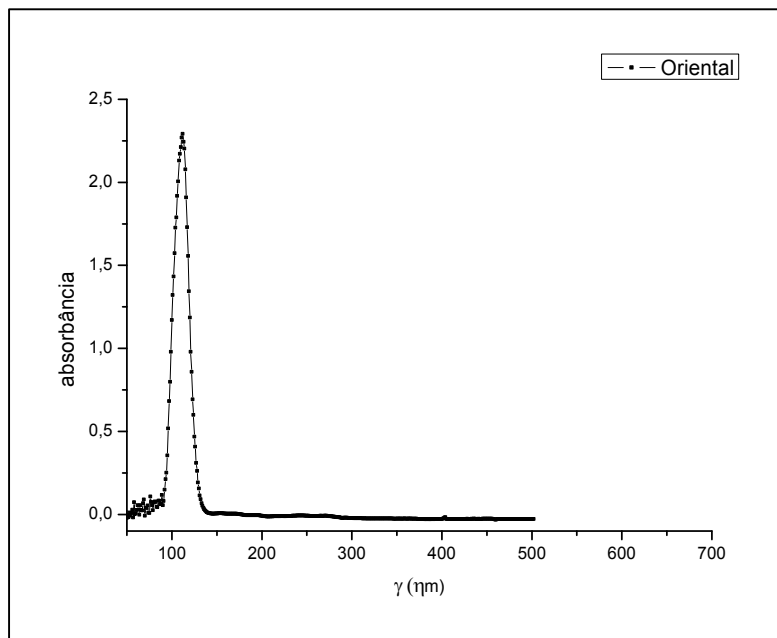


Figura suplementar 9 - Perfil espectrofotométrico típico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato acetona: éter de petróleo, obtido a partir do tecido parequimático de raízes do genótipo Oriental (Polpa da raiz com coloração branca).

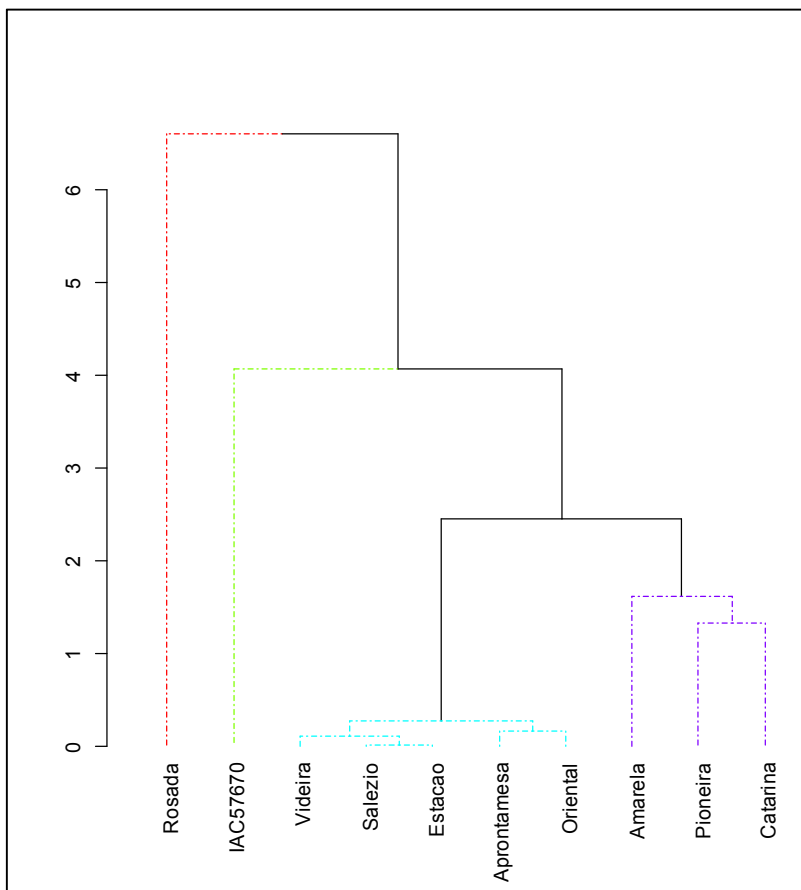


Figura suplementar 10 - Análise de agrupamento hierárquica (UPGMA) a partir dos dados da quantificação cromatográfica dos compostos carotenóidicos por CLAE. A similaridade entre genótipos membros de um mesmo *cluster* é significativa estatisticamente, quando as ramificações no dendograma apresentam a mesma coloração⁴. Correlação cofenética de 99,8%.

⁴ Significância determinada através da análise *Simprof* (*Similarity Profile Analysis*) do pacote *Clustsig* do R, de acordo com Clarke, Somerfield & Gorley, (2008)

Script implementado em R para análise dos dados quantitativos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência

```
# *****
# 1. PCA - Análise de Componentes Principais - Dados CLAE
# *****
library(stats)
library(ade4)
library(gclus)
library(ape)
library(vegan)
setwd("C:/Users/Windows/Documents/Mestrado Biologia Vegetal/Dados
para o R")
getwd()
HPLC3REP<- read.table("HPLC3REP.txt", header=TRUE, dec=",")
HPLC3REP
summary(HPLC3REP)
# Primeiro a análise baseando-se numa matriz de correlacao e depois pela
matriz de covariancia
# A funcao princomp do pacote stats faz a analise dos componentes
principais
HPLC3REP.pca <- princomp(HPLC3REP, cor=TRUE) # usando matriz de
correlacao
## HPLC3REP.pca <- princomp(HPLC3REP) ##opcao para usar a matriz
de covariancia
summary(HPLC3REP.pca)
HPLC3REP.pca # aqui os autovalores de cada componente principal
plot(HPLC3REP.pca) # aqui apenas a plotagem dos autovalores de cada
componente principal- observe que 1 e 2 tem valores mais altos, o que
indica o quanto que eles acumularam de variacao em relacao aos outros.
loadings(HPLC3REP.pca) #retorna a contribuição das variaveis originais
aos novos componentes (autovetores) (não os valores exatos de correlação)
HPLC3REP.pca$loadings # resulta nos mesmos dados da funcao anterior
HPLC3REP.pca$scores
biplot(HPLC3REP.pca,choices=1:2, var.axes=TRUE, col=1, cex=0.5,
xlab="Componente principal 1 - 45,58%", ylab="Componente principal 2 -
28,27", expand = 1, arrow.len = 0.05)
HPLC3REP.rda.pca<- rda(HPLC3REP, scale=T) # scale = T - matriz de
correlacao, scale = F - matriz de covariancia
HPLC3REP.rda.pca
summary(HPLC3REP.rda.pca)
HPLC3REP.load <- HPLC3REP.rda.pca$CA$v #retorna as correlacoes dos
variaveis originais aos novos componentes (autovetores)
HPLC3REP.load
```

```

biplot(HPLC3REP.rda.pca, scaling=2, main="PCA - scaling 2") # biplot de
correlacao - representa melhor as relacoes de correlacao entre as variaveis
biplot(HPLC3REP.rda.pca, scaling=2, main="PCA - scaling 2",
xlab="Componente principal 1 = 45,58%", ylab="Componente principal 2 =
28,27%")
points(HPLC3REP.rda.pca)
# por sua vez a opcao considerando a melhor representacao de distancias
euclidianas entre amostras e atraves da opcao scaling 1:
biplot(HPLC3REP.rda.pca, choices=1:2, scaling=1, main="PCA - scaling 1")
# biplot de distancia - representa melhor as distancias euclidianas entre
objetos
# Examinar e plotar resultados parciais do PCA (adaptado de Borcard et al
2011)
# Autovalores
HPLC3REP.eig <- HPLC3REP.rda.pca$CA$eig
HPLC3REP.eig
# Aplicando o criterio de Kaiser-Guttman para a selecao de eixos (Borcard
et al 2011)
HPLC3REP.eig[HPLC3REP.eig > mean(HPLC3REP.eig)]
# Modelo de Broken stick (vara-quebrada) para estudo dos componentes
significativos para analise:
n <- length(HPLC3REP.eig)
bsm <- data.frame(j=seq(1:n), p=0)
bsm$p[1] <- 1/n
for (i in 2:n) {
  bsm$p[i] = bsm$p[i-1] + (1/(n + 1 - i))
}
bsm$p <- 100*bsm$p/n
bsm

#abaixo o gráfico resultante da analise (veja a linha de corte)

# Plotar os autovalores e as %s de variancia de cada eixo
windows(title="Autovalores de PCA")
par(mfrow=c(2,1))
barplot(HPLC3REP.eig, main="Autovalores", col="bisque", las=2)
abline(h=mean(HPLC3REP.eig), col="red") # Media dos autovalores
legend("topright", "Media de autovalores", lwd=1, col=2, bty="n")
barplot(t(t(cbind(100*HPLC3REP.eig/sum(HPLC3REP.eig),bsm$p[n:1]))),
beside=TRUE,
  main="% de variancia", col=c("bisque",2), las=2)
legend("topright", c("% de variancia", "Modelo de vara-quebrada"),
  pch=15, col=c("bisque",2), bty="n")

```